

*Parallel artificial liquid membrane  
extraction (PALME)* av basiske  
legemidler fra plasma – Hvor effektiv  
er opprensningen?

Turgay Bardakci



Faggruppen for Legemiddelanalyse  
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi  
Farmasøytisk Institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014

# *Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME)* av basiske legemidler fra plasma – Hvor effektiv er opprensningen?

Turgay Bardakci

Masteroppgaven ble gjennomført ved faggruppen for Legemiddelanalyse, avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo i perioden februar 2013 til mai 2014.

Veiledere:                      Professor Stig Pedersen – Bjergaard  
  
Første amanuensis Astrid Gjelstad  
  
Avdelingsingeniør Marthe Petrine Parmer

© Turgay Bardakci

2014

*Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME)* av basiske legemidler fra plasma –  
Hvor effektiv er opprensningen?

Turgay Bardakci

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Forord

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere, professor Stig Pedersen-Bjergaard, første amanuensis Astrid Gjelstad og avdelingsingeniør Marthe Petrine Parmer for meget god veiledning og oppfølging under arbeidet med masteroppgaven. Takk for at det var aldri problem å spørre dere om råd og for at dere alltid var tilgjengelige.

I tillegg vil jeg takke Audun, Kristine, Navera, Sadiq, og ansatte på avdelingen for at dere gjorde tiden som masterstudent til en veldig hyggelig og minnerik tid for meg.

Jeg vil rette en spesiell takk til Diako Darian for hans kontinuerlig oppmuntring og støtte som gjorde hele farmasistudiet enklere.

Til slutt vil jeg takke min familie for den tilliten de har gitt meg og motivert meg gjennom hele utdanningen.

Oslo, mai 2014

Turgay Bardakci

# Innholdsfortegnelse

1	SAMMENDRAG .....	VII
2	FORKORTELSER .....	VIII
3	INNLEDNING .....	1
4	TEORI .....	5
4.1	Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME).....	5
4.2	Organisk- og akseptorfase i PALME for ekstraksjon av basiske legemidler.....	8
4.3	Væskekromatografi (High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)).....	8
4.3.1	Omvendt-fase kromatografi .....	11
4.4	Væskekromatografi i kombinasjon med massespektrometri (LC-MS).....	12
4.4.1	Massespektrometri .....	12
4.4.2	Matrikseffekter i LC-MS.....	16
4.5	Kapillærelektroforese (CE) .....	18
4.5.1	Indirekte UV-deteksjon med CE .....	19
4.6	Prøve matrix .....	19
5	EKSPERIMENTELT .....	20
5.1	Valg av modellanalytter .....	20
5.2	Utstyr og fremgangsmåte for PALME .....	21
5.3	Kjemikalier.....	22
5.4	Løsninger.....	23
5.4.1	Stamløsninger.....	23
5.4.2	Standardløsninger.....	23
5.4.3	Donorfaser.....	23
5.4.4	Akseptorfase.....	23
5.4.5	Organiske faser.....	23
5.4.6	Mobilfaser til HPLC og LC-MS/MS.....	24
5.4.7	Andre løsninger .....	24
5.5	Prøveopparbeidelse .....	25
5.5.1	Ekstraksjonsprosedyrer .....	25
5.6	Betingelser for analyse .....	27
5.6.1	HPLC-betingelser.....	27
5.6.2	LC-MS/MS-betingelser .....	28

5.6.3	CE-betingelser .....	30
5.7	Beregning av ekstraksjonsutbytter .....	31
5.8	Evaluering av PALME-ekstraktenes renhet .....	32
5.8.1	Monitorering av UV-absorberende komponenter .....	32
5.8.2	Monitorering av små ioner i PALME-ekstrakter .....	32
5.8.3	Monitorering av fosfolipider .....	33
5.8.4	Evaluering av matrikseffekter i LC-MS .....	34
5.9	Q-test .....	34
6	RESULTATER OG DISKUSJON .....	35
6.1	Ekstraksjonsutbytter .....	35
6.2	Undersøkelse av ekstraktenes renhet .....	38
6.2.1	Monitorering av UV-absorberende komponenter med HPLC .....	38
6.2.2	Monitorering av ioner og UV-absorberende komponenter med CE .....	41
6.2.3	Monitorering av fosfolipider med LC-MS .....	45
6.2.4	Evaluering av matrikseffekter i LC-MS .....	51
7	KONKLUSJON .....	58
	Referanser .....	60

# 1 SAMMENDRAG

”Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction” (PALME) er et helt nytt multibrønns konsept for væske-væske ekstraksjon. Et prøvevolum på 200 – 250 µl fylles i små brønner i en multibrønns donorplate. Før ekstraksjon justeres pH i donorløsningen slik at analyttene av interesse blir uladet. Over donorplaten plasseres det en multibrønn akseptorplate. I bunnen av hver brønn i akseptorplaten er det et filter og over hvert filter er det et væskereservoar. Før ekstraksjonen pipetteres det inn 2-3 µl organisk løsningsmiddel i hvert filter. Dette organiske løsningsmiddelet er ikke blandbart med vann og danner en kunstig væskemembran. Over den kunstige væskemembranen fylles akseptorløsningen og et typisk volum er 50 µl. pH i akseptorløsningen justeres slik at når analyttene ekstraheres gjennom den kunstige væskemembranen og inn i akseptorløsningen blir de ladet. Dette hindrer tilbakeekstraksjon av analyttene. Donorplaten og akseptorplaten trykkes sammen, og begge platene rystes i 15-45 minutter. Etter endt ekstraksjon kan akseptorløsningen analyseres direkte med LC-MS, HPLC eller CE.

Hensikten med denne oppgaven var å vise at PALME gir ekstrakter som er frie for endogene komponenter som fosfolipider og ioner fra biologiske matrikser. Det ble gjort forsøk med forskjellige akseptorplater. Både polypropylen- og polyvinylidenfluorid-baserte akseptorplater ble testet. Som organisk løsningsmiddel ble det bruk diheksyleter, isopentylbenzen og dodecylacetat. Ekstraksjonsutbytter med ulike organisk faser og akseptorplater ble undersøkt.

Polyvinylidenfluorid-baserte akseptorplater ga renere ekstrakter sammenlignet med polypropylen-baserte akseptorplater. Ekstraktene var frie for endogene komponenter som fosfolipider. Polypropylen-baserte akseptorplater sammenlignet med tradisjonelle prøveopparbeidelsesmetoder som fast-faseekstraksjon og proteinfelling ga ”renere” ekstrakter. Det vises at kombinasjonen av isopentylbenzen og polyvinylidenfluorid-baserte akseptorplater gir fosfolipidfrie ekstrakter og graden av matrikseffekter er  $\leq 4,1$  %.

Dodecylacetat som organisk fase ga høyest ekstraksjonsutbytte fra plasma som prøvematriks. Det ble vist at dodecylacetat gir ekstraksjonsutbytter på 54,2 – 90,5 % med RSD-verdier mellom 2,4 % og 8,9 %.

## 2 FORKORTELSER

°C	Celsiusgrader
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
µA	Mikroampere
µm	Mikrometer
APCI	Atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon
APPI	Atmosfæretrykk-foto-ionisasjon
C18	Karbon 18, hydrofob stasjonærfase
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	Acetonitril
C <sub>a</sub>	Konsentrasjon av analytt i akseptorløsning
ca.	Cirka
CE	Kapillærelektroforese
C <sub>eq,a</sub>	Analytt konsentrasjon i donorfase ved likevekt
C <sub>eq,d</sub>	Analytt konsentrasjon i donorfase ved likevekt
C <sub>eq,o</sub>	Analytt konsentrasjon i organisk fase ved likevekt
CID	Kollisjon-indusert dissosiasjon
Cl <sup>-</sup>	Kloridion
cm	Centimeter
C <sub>s</sub>	Konsentrasjon av analytt i donorløsning
EME	Elektromembranekstraksjon
EOF	Elektroosmotisk flow
ESI	Elektrosprayionisasjon
GC	Gasskromatografi
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Fosforsyre
HCOOH	Maursyre
HPLC	Væskeskromatografi, High-Performance Liquid Chromatography
IPB	Isopentylbenzen
K <sub>a/d</sub>	Fordelingskoeffisienten mellom akseptor- og donorfase
K <sub>a/org</sub>	Fordelingskoeffisienten mellom akseptor- og organisk fase
KCl	Kaliumklorid
KCrO <sub>4</sub>	Kaliumkromat
K <sub>d</sub>	Fordelingskoeffisient
K <sub>org/d</sub>	Fordelingskoeffisienten mellom organisk- og donorfase
Kv	Kilovolt
L	Liter
LC-MS	Væskeskromatografi koblet til et massespektrometer
LLE	Væske-væske ekstraksjon
logP	Fordelingskoeffisienten n-oktanol/vann
LPME	Væskefase-mikroekstraksjon
Lyso-PC	Lysofosfatidylkolin
Lyso-PE	Lysofosfatidyletanolamin
Lyso-PG	Lysofosfatidyl-glycerol
Lyso-PS	Lysofosfatidylserin
M	Molar



m/z	Masse over ladning
mAU	Milliabsorpsjonsenheter
mg	Milligram
Min	Minutter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRM	Multippel reaksjon monitorering ( <i>Multiple reaction monitoring</i> )
MS	Massespektrometri
mTorr	Millitorr
N <sub>2</sub>	Nitrogengass
n <sub>a</sub>	Stoffmengde i akseptorløsning
Na <sup>+</sup>	Natrium ioner
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
NH <sub>4</sub> OH	Ammoniumhydroksid
ng	Nanogram
n <sub>s</sub>	Stoffmengde i donorløsning før ekstraksjon
PALME	Parallel artificial liquid membrane extraction
PC	Fosfatidylkolin
PE	Fosfatidyletanoletanolamin
PG	Fosfatidylglyserol
PI	Fosfatidylinositol
PP	Polypropylen
PPE	Proteinfelling
PS	Fosfatidylserin
PVDF	Polyvinyliden fluorid
rpm	Omdreining per minutt (Revolutions per minute)
RSD	Relativ standardavvik
S/N	Signal til støy forhold
SD-LPME	Singel-drop-væskefase-mikroekstraksjon
sek	Sekunder
SLM	Supported liquid membrane
SM	Sfingomyeliner
SPE	Fast-faseekstraksjon
SPME	Fast-fasemikroekstraksjon
SRM	Selektiv reaksjon monitorering ( <i>Selectiv reaction monitoring</i> )
TOF	Time of flight
TTAB	Tetradecyltrimetylammoniumbromid
V	Volt
v/v	Blandings forhold i volum
V <sub>a</sub>	Volum av akseptorløsning
V <sub>s</sub>	Volum av donorløsning

### 3 INNLEDNING

For å kunne analysere legemidler i biologiske prøver ved hjelp av kromatografiske metoder er det viktig at man har en god prøveopparbeidelsesmetode. Siden biologiske prøver som blod, plasma, serum og urin ofte har en kompleks sammensetning, skal prøveopparbeidelsesmetoden kunne fjerne alle de uønskede komponentene fra prøven. Disse uønskede komponentene kan påvirke analyseresultatene og kan ødelegge analyseapparatet. Generelt er legemidlene i svært lave konsentrasjoner i biologiske prøver, og derfor er det viktig at metoden kan gi høyt utbytte og oppkonsentrering av analyttene som er av interesse.

Tradisjonelt sett er væske-væske ekstraksjon (LLE) og fast-faseekstraksjon (SPE) de mest brukte prøveopparbeidelsesmetodene. Disse metodene baserer seg på fordeling av analyttene mellom to faser. I SPE er ekstraksjonen basert på fordeling av analytten(e) mellom en fast sorbent og en væske, mens i LLE baserer ekstraksjonen seg på fordeling av analyttene mellom to ikke-blandbare væsker, vanligvis ett organisk løsningsmiddel og en vandig løsning. Begge disse teknikkene gir normalt høyt ekstraksjonsutbytte og god opprensning av biologiske prøver. Disse teknikkene har en del ulemper. I LLE bruker man store mengder av løsemidler, LLE er vanskelig å automatisere og ofte trenger man å dampe inn det organiske løsningsmidlet. Ulempene med SPE er at man bruker store mengder løsemidler, engangsutstyret er dyrt, man oppnår i noen tilfeller ikke god nok opprensning av prøver og i noen tilfeller må løsemidlet dampes inn. Dette har fått forskere til å utvikle nye prøveopparbeidelsesmetoder som kan redusere prøveopparbeidelsestiden, prøvevolumet og bruken av organiske løsningsmidler.

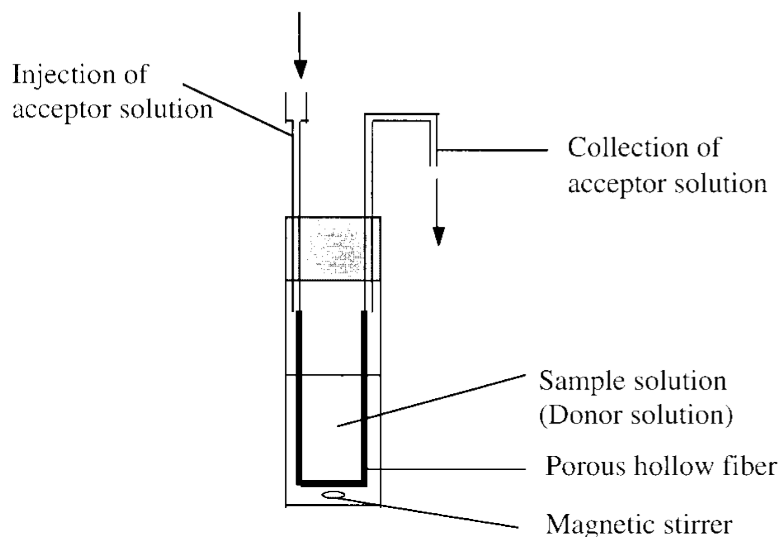
På 1990-tallet kom de første arbeidene i miniatyriserte prøveopparbeidelse. Det første arbeidet i miniatyrisert fast-faseekstraksjon (SPME) ble introdusert i 1990 [1]. I SPME adsorberes analyttene i prøven på en liten mengde sorbent som er dispergert i en fast bærer. Man oppnår en konsentrasjonslikevekt mellom sorbent og prøveløsningen hvis sorbenten utsettes tilstrekkelig for prøveløsningen. Etter at man har oppnådd denne likevekten vil ikke en lengre ekstraksjonstid øke utbyttet av analyttene man er interessert i [2].

Utviklingen av miniatyrisert prøveopparbeidelse var ikke begrenset bare til SPE, i de senere årene har forskere begynt å introdusere nye miniatyriserte prøveopparbeidelsesmetoder som er basert på væske-væske ekstraksjon. De første arbeidene i væskefase-mikroekstraksjon

(liquid-phase microextraction (LPME)) ble introdusert i andre halvdel av 1990-tallet. Første arbeidet i LPME kom i 1996 [3]. Disse arbeidene i LPME baserte seg på ekstraksjon av analytter fra en vandig prøve med en liten dråpe av organisk løsningsmiddel. I 1997 kom metoden singel-drop væskefase-mikroekstraksjon (SD-LPME) som baserte seg på ekstraksjon av stoffer fra vandige prøver over i en liten dråpe av et organisk løsningsmiddel som var plassert på tuppen av en kanyle [4]. Drivkraften i metoden var fordelingskoeffisienten ( $K_d$ ) av analyttene mellom organisk løsningsmiddel og prøven. Det har blitt utviklet to-fase og tre-fase formater av LPME, hvor analyttene kunne analyseres direkte i henholdsvis gasskromatografi (GC) og væskeskromatografi (HPLC). I to-fase systemet der analyttene ekstraheres fra en vandig prøve over i et organisk løsningsmiddel, kan man analysere analyttene direkte ved hjelp av GC. Tre-fase systemet involverer tilbakeekstraksjon, først ekstraheres analyttene fra vandig prøve over i en organisk fase og deretter tilbakeekstraheres analyttene over i en vandig akseptorfase, som man kan analysere direkte på HPLC. Det store forholdet mellom volum av løsningsmiddel og prøvevolumet gir oppkonsentrering av analyttene og har redusert bruken av organisk løsningsmiddel dramatisk [2].

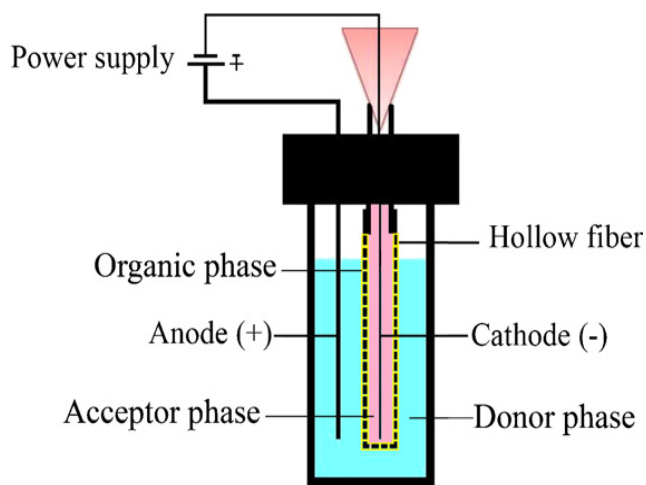
SD-LPME har fått lite oppmerksomhet siden dråpen som var plassert på tuppen av kanylen var ustabil under ekstraksjonen. Man måtte riste ekstraksjonsenheten kraftig under ekstraksjonen. Dette førte til mekanisk ustabilitet av dråpen under ekstraksjonen, og dråpen havnet lett i akseptorløsningen [2].

For å bedre stabiliteten av den organiske dråpen, utviklet Pedersen-Bjergaard og Rasmussen en ny metode for LPME i 1999 [5]. I denne teknikken ble analyttene i en vandig prøve ekstrahert gjennom et organisk løsningsmiddel som var immobilisert i en porøs hulfibermembran og videre inn i en vandig akseptorløsning på den andre siden av membranen. Det immobiliserte organiske løsningsmidlet danner en tynn kunstig væskemembran, (supported liquid membrane (SLM)). Drivkraften i denne teknikken var pH-forskjellen mellom prøven og akseptorløsningen. Figur 3.1 viser en prinsippskisse av ekstraksjonsenheten. Teknikken ga god opprensning av prøven siden kun analyttene av interesse kunne passere organisk fasen. Fordelen med denne teknikken var oppkonsentrering av analytter og opprensning av prøven, i tillegg til lite bruk av organisk løsningsmiddel. Denne teknikken var litt tidskrevende med ekstraksjonstider mellom 15 til 60 minutter [6].



**Figur 3.1: Prinsippskisse av ekstraksjonsenhet for LPME [5].**

For å redusere ekstraksjonstiden utviklet Pedersen-Bjergaard og Rasmussen en ny metode, elektromembranekstraksjon (EME) i 2006 [7]. Denne teknikken baserte seg på et tre-fase system der analyttene ble ekstrahert gjennom en tynn og kunstig væskemembran. Figur 3.2 viser en prinsippskisse av ekstraksjonsenheten i EME. Teknikken skiller seg fra LPME ved at man bruker en elektrisk spenning som drivkraft i ekstraksjonen. I tillegg til pH justering i prøven ble det brukt to elektroder. Den ene elektroden ble plassert i prøven, mens den andre ble plassert i akseptorløsningen [7]. Etter surgjøring av prøven ble det pålagt en spenning, og dette førte til at basiske analytter migrerte fra prøveløsningen til akseptorløsningen. Det ble påvist at man kunne ekstrahere basiske analytter med maksimalt utbytte innen fem minutter [7].



**Figur 3.2: Prinsippskisse av ekstraksjonsenheten i EME [8]. Enheten består av donor- og akseptorfase, organisk fase, anode og katode, hulfiber og spenningskilde.**

En av de nyeste væske-væske ekstraksjonsmetodene er *parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME) i multibrønns konsept som ble introdusert i 2013 (se figur 4.1) [9]. Denne metoden baserer seg på tre-fase LPME, men her bruker man flate membraner. Analyttene av interesse ekstraheres gjennom en kunstig væskemembran og over i akseptorløsningen. Typisk ekstraksjonstid er 15-45 minutter [9]. Etter endt ekstraksjon kan ekstraktet injiseres direkte på HPLC, LC-MS eller CE.

I moderne farmasøytiske laboratorier brukes det ofte LC-MS for kvantitativ analyse av legemidler. LC-MS er følsom i forhold til matrikseffekter. Derfor er det viktig at prøvene/ekstraktene man analyserer inneholder bare de analyttene man er interessert i, og at de i størst mulig grad er frie for endogene og eksogene komponenter. Tilstedeværelse av for eksempel endogene komponenter som fosfolipider i ekstraktet kan gi en forsterkning eller undertrykking av signaler [10-19], noe som kan gi et upålitelig analysesvar. Selv om det har blitt påvist at PALME var en effektiv metode med tanke på ekstraksjonstid, ekstraksjonskostnader per prøve og utbytter av analytter, har det ikke blitt gjort noe studier der man har undersøkt ekstraktens renhet fra biologiske prøver. Formålet med dette prosjektet var derfor

❖ Undersøkelse av prøvematriks-relaterte komponenter i akseptorløsning

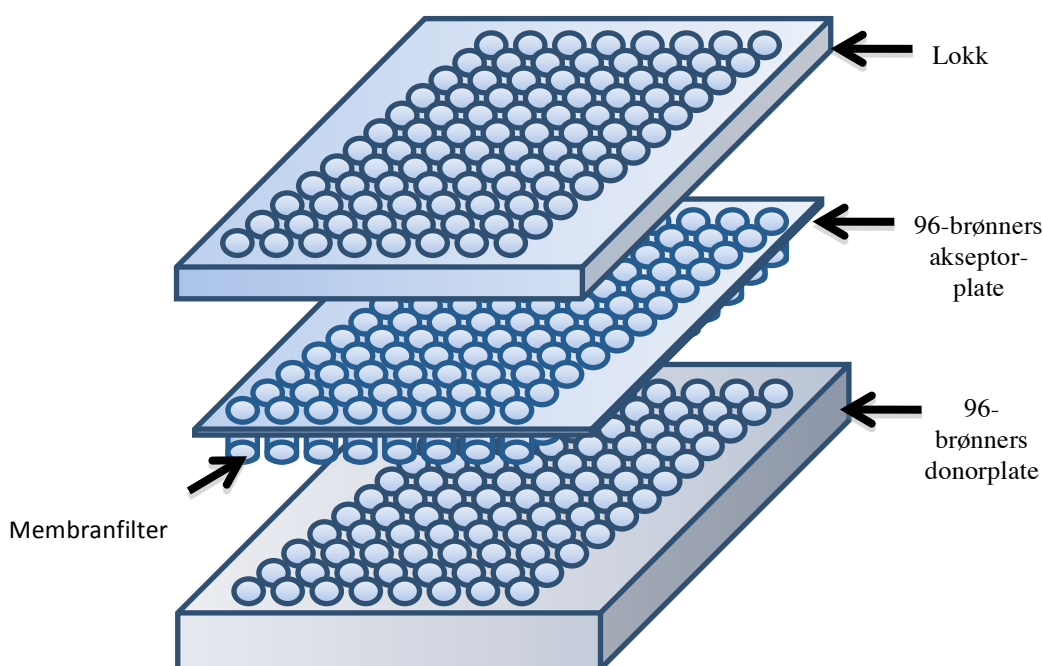
- Sjekke for HPLC-UV påvisbare matrikskomponenter
- Sjekke for LC-MS påvisbare matrikskomponenter
  - Identifisere matrikskomponenter hvis de blir detektert
- Sjekke for eventuelle fosfolipider i akseptorløsningen ved hjelp av LC-MS
- Kvantitativ og kvalitativ analyse av matrikseffekter relatert til LC-MS
- Sjekke for CE-direkte UV-detekterbare matrikskomponenter
- Sjekke for CE-indirekte UV-detekterbare matrikskomponenter (salter)
- Konduktivitets måling av akseptorløsning

❖ Undersøkelse av ekstraksjonsutbytter av modellanalyttene fra plasma

## 4 TEORI

### 4.1 Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME)

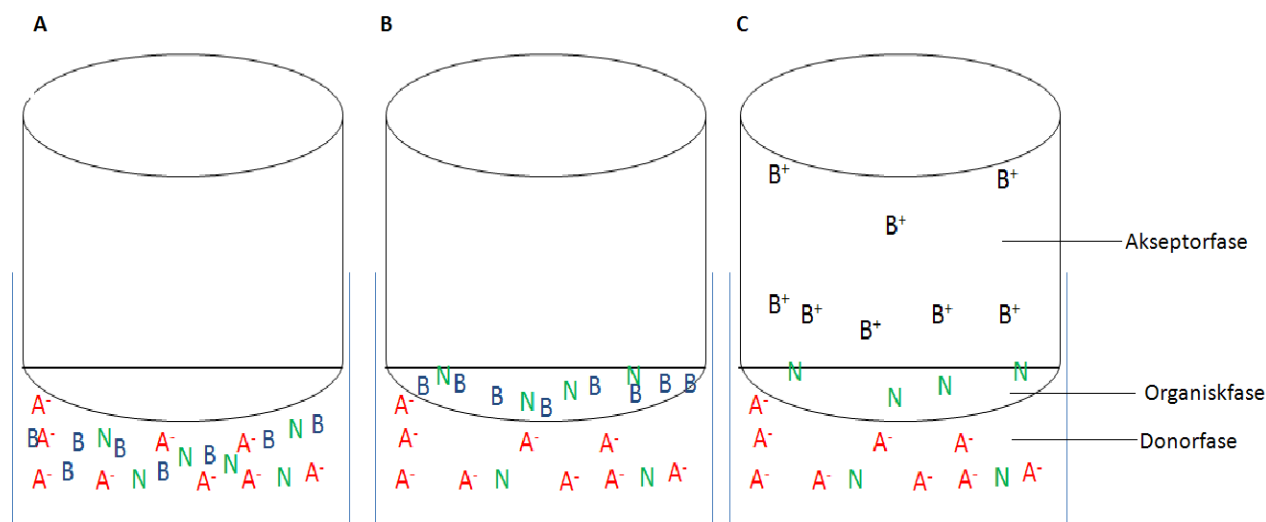
I PALME ekstraheres analyttene fra en prøve (donorfase) gjennom en kunstig væskemembran og videre inn i en akseptorløsning (akseptorfase). Drivkraften i PALME er passiv diffusjon. Metoden har flere fordeler sammenlignet med de vanlige prøveopparbeidelsesmetodene som fast-faseekstraksjon (SPE) og væske-væske ekstraksjon (LLE). De viktigste fordelene med PALME er lite bruk av organisk løsningsmiddel, lave ekstraksjonskostnader per prøve, automatiseringsmuligheter, enkel work-flow og trolig høy opprensning av biologiske prøver [9].



Figur 4.1: Prinsippskisse av ekstraksjonsenheden i PALME [9].

Figur 4.1 viser et ekstraksjonsoppsett for PALME. Ekstraksjonsenheden består av tre deler. Den nederste delen er donorplaten. Den har 96 brønner og fylles med prøvene man vil analysere, et typisk prøvevolum er 200-250  $\mu\text{l}$ . Før PALME er det viktig at man justerer pH i prøven slik at analyttene man er interessert i blir på sine uladete form. For basiske analytter tilsetter man en base for å gjøre prøven basisk. Den midterste delen av enheten er en

akseptorplate. Denne platen har også 96 brønner. I bunnen av hver brønn er det et membranfilter og over hvert membranfilter er det et væskereservoar. Før man ekstraherer prøven pipetterer man inn 2-2,5 µl organisk løsningsmiddel i hvert membranfilter. Dette organiske løsningsmidlet skal være ikke-blandbart med vann, noe som gjør at man får dannet en kunstig væskemembran. Væskereservoaret som er over den kunstige væskemembranen fylles med en akseptorløsning. For ekstraksjon av basiske analytter skal denne akseptorløsningen være sur. PALME kan sannsynligvis brukes også til ekstraksjon av sure stoffer, da må man gjøre prøven sur og bruke en basisk akseptorløsning. Deretter trykkes donorplaten og akseptorplaten sammen og lokket, som er den tredje delen i ekstraksjonsenheten, settes over akseptorplaten. Man bruker lokket for å unngå fordampning av akseptorløsningen og for å hindre kontaminering av ekstraktet. Deretter settes hele enheten til rysting i 15 – 45 minutter. I løpet av denne tiden vil uladete analytter i hver prøve ekstraheres gjennom hver sin kunstig væskemembran og videre inn i hver sin akseptorløsning. Her vil analyttene bli ladet og dette hindrer tilbakeekstraksjon av analyttene. Etter endt ekstraksjon kan ekstraktene analyseres direkte med for eksempel HPLC, LC-MS eller CE [9]. Figur 4.2 illustrerer ekstraksjonsprosessen ved PALME.



**Figur 4.2: Ekstraksjonsprosessen ved PALME. Figur A illustrerer ekstraksjonsprosess før risting av ekstraksjonsenhet, figur B illustrerer ekstraksjonsprosess under kraftig risting av ekstraksjonsenhet og figur C illustrerer endt ekstraksjon. A<sup>-</sup> representerer sure komponenter, B representerer basiske komponenter og N representerer nøytrale komponenter i basisk miljø. B<sup>+</sup> representerer basiske komponenter i surt miljø.**

Figuren illustrerer ekstraksjon av basiske komponenter fra humant plasma som ofte har en kompleks sammensetting. Basiske komponenter vil være uladet mens sure komponenter blir deionisert i basisk miljø. Dette gjør at løseligheten av basiske komponenter reduseres i donorfase mens den øker i organisk fase. Når man rister ekstraksjonsenheten kraftig vil komponentene i donorfase komme i kontakt med organisk fase. Under denne prosessen vil uladete basiske komponenter løse seg i organisk fase. Igjen under risting vil de basiske legemidlene som er løst i organisk fase komme i kontakt med sur akseptorfase. Her vil de bli ladet. Denne vil redusere løseligheten av basiske legemidlene i organisk fase og dermed hindrer tilbakeekstraksjon av basiske komponenter.

Som nevnt tidligere baserer PALME seg på tre-fase væskefase-mikroekstraksjon (LPME) med flate membraner. Drivkraften er passiv diffusjon av analytter. I tre-fase LPME ekstraheres analyttene fra vandige prøver med passiv diffusjon gjennom en organisk løsning som er immobilisert i hulfiberen og videre inn i akseptorløsningen. Dette kan illustreres med følgende ligning,

$$A_{\text{donorfase}} \rightleftharpoons A_{\text{organisk fase}} \rightleftharpoons A_{\text{akseptorfase}} \quad (1)$$

Som man ser fra ligningen er det en likevekt mellom analyttkonsentrasjon i henholdsvis donorfase ( $A_{\text{donorfase}}$ ), organisk fase ( $A_{\text{organisk fase}}$ ) og akseptorfase ( $A_{\text{akseptorfase}}$ ). Hele ekstraksjonsprosessen påvirkes både av fordelingskoeffisienten mellom organisk fase og donorfase og fordelingskoeffisienten mellom akseptorfase og organisk fase. Fordelingskoeffisientene kan defineres med følgende ligninger

$$K_{\text{org/d}} = C_{\text{eq, org}} / C_{\text{eq, d}} \quad (2)$$

$$K_{\text{a/org}} = C_{\text{eq, a}} / C_{\text{eq, org}} \quad (3)$$

hvor  $C_{\text{eq, org}}$  er analytt konsentrasjon i organisk fase ved likevekt,  $C_{\text{eq, d}}$  analytt konsentrasjon i donorfase ved likevekt, og  $C_{\text{eq, a}}$  analytt konsentrasjon i akseptorfase ved likevekt [20]. Fordelingskoeffisienten mellom akseptorfase og organisk fase antas å være drivkraften i LPME og regnes etter følgende ligning,

$$K_{\text{a/d}} = C_{\text{eq, a}} / C_{\text{eq, d}} = K_{\text{org/d}} \times K_{\text{a/org}} \quad (4)$$

Før ekstraksjon med LPME må det dannes en kunstig væskemembran (supported liquid membrane (SLM)). Denne lages ved å fylle porene i hulfiberen med et organisk



løsningsmiddel. Dette kan gjøres enten å dyppe hulfiberen i et organisk løsningsmiddel eller ved å pipettere en liten mengde organisk løsningsmiddel inn i hulrommene i hulfiberen. I begge tilfellene vil det organiske løsningsmiddelet bli immobilisert i porene [21]. Dette vil danne en effektiv barriere mellom donorfasen og akseptorfasen. Etter å ha dannet SLM justeres pH i donorfasen (prøven som skal analyseres) slik at analyttene av interesse blir i sine uladete form. Dette betyr at for å ekstrahere baser må man ha en høy pH. På grunn av den lave løseligheten av analyttene i den basiske prøven og tilsvarende høye løseligheten i akseptorløsningen ekstraheres analyttene fra donorfasen gjennom organisk fasen som er immobilisert i hulfiberen og inn i akseptorløsningen. Analyttene blir ionisert i sur akseptorløsning og dette hindrer tilbakeekstraksjon av analyttene [5].

Siden PALME er et helt nytt konsept har det ikke blitt gjort mye forskning i dette området. Det første og eneste arbeidet i dette området ble introdusert av Gjelstad og sine medarbeidere i 2013 [9]. I dette arbeidet ble petidin, haloperidol, metadon og nortriptylin ekstrahert fra plasma. Det ble påvist at man kunne ekstrahere disse analyttene på 30 minutter og få et utbytte av analyttene på 34-74 % [9].

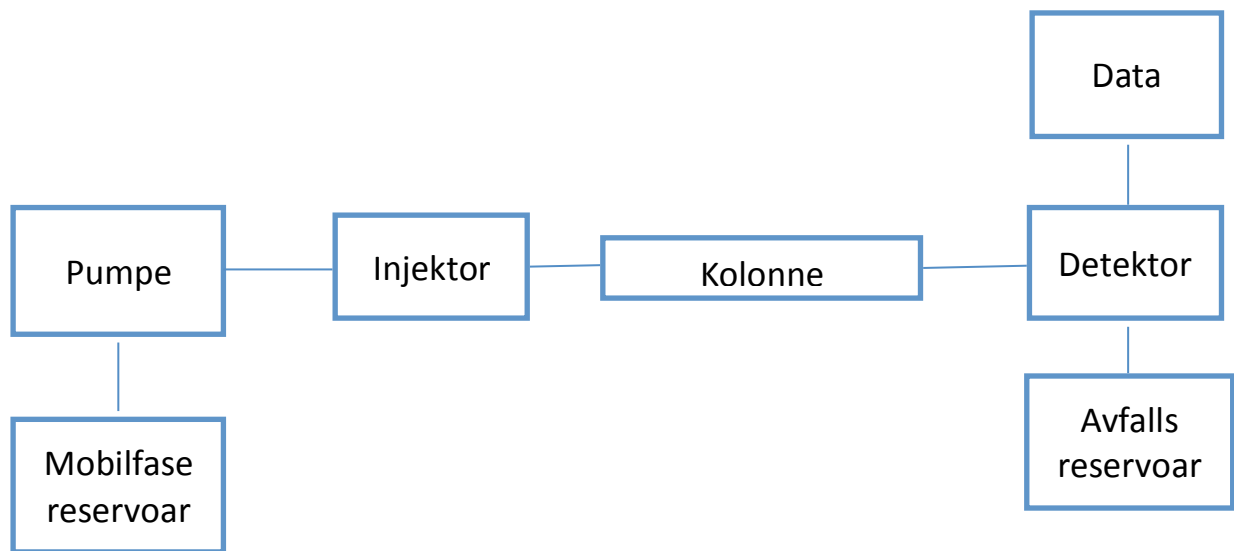
## **4.2 Organisk- og akseptorfase i PALME for ekstraksjon av basiske legemidler**

Som tidligere nevnt er drivkraften i PALME passiv diffusjon av analytter fra donorfasen, gjennom den kunstige væskemembranen og videre inn i akseptorløsningen. Derfor er det viktig at man har et organisk løsningsmiddel som er både ikke-blandbart med vann og et godt løsemiddel for de analyttene man ønsker å analysere. Tidligere forsøk har vist at alifatiske etere, aromatiske hydrokarboner, ketoner og nitriler har gitt gode resultater for ekstraksjon av basiske stoffer basert på væskefase-mikroekstraksjon [9, 22-24]. I disse forsøkene ble det brukt enten maursyre eller saltsyre som akseptorløsning.

## **4.3 Væsekromatografi (High-Performance Liquid Chromatography (HPLC))**

Separasjonen i væsekromatografi baserer seg på retensjon av analyttene på en stasjonærfase. Denne retensjonen skyldes interaksjon mellom analytter og kolonnematerialet

(stasjonærfasen). Mobilfase reservoar, pumpe, injektor, kolonne, detektor, datamaskin og avfallsreservoar er hoveddelene i et HPLC apparatur (se figur 4.3).

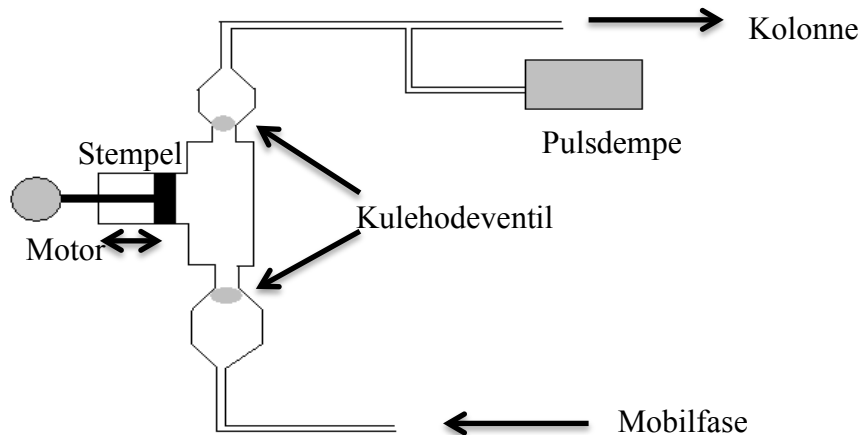


**Figur 4.3: Prinsippskisse av HPLC**

Hele separasjonen i et HPLC-system foregår i kolonnen. Derfor er det viktig at man har en kolonne som separerer analyttene på kortest mulig tid og er selektive for de analyttene man er interessert i. En vanlig HPLC-kolonne er typisk 10-25 cm langt rør pakket med partikler. Den mest vanlige partikkelstørrelsen i en HPLC-kolonne er 5  $\mu\text{m}$  [25].

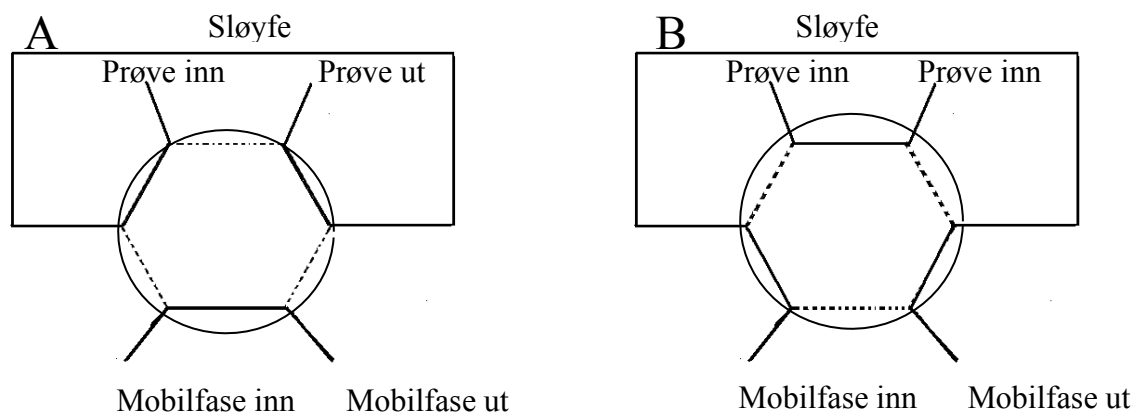
For at detektoren skal detektere stoffene må de elueres ut av kolonnen. Dette gjøres ved hjelp av pumper som presser mobilfasen med konstant hastighet gjennom kolonnen. Det finnes mange forskjellige typer av pumper, men den mest vanlige er stempelpumpe. Figur 4.4 viser en prinsippskisse av en stempelpumpe. Motoren på pumpen fører stempelet frem og tilbake. De kuleventilene sørger for at mobilfasen strømmes bare i en vei. Når den ene kuleventilen åpnes stenges den andre kuleventilen. Mobilfasen trekkes inn i sylindren når stempelet trekkes ut av stempelet. Under denne prosessen stenges den øverste kuleventilen mens den nederste kuleventilen åpnes. Når mobilfasen pumpes inn i kolonnen føres stempelet inn i sylindren og samtidig den nederste kuleventilen stenges og den øverste åpnes. I de aller

fleste tilfellene brukes det flere pumper samtidig og de har hvert sitt eget væskereservoar [25]. Væskene blandes sammen i HPLC-apparatet, der man selv bestemmer blandingsforholdet.



Figur 4.4: Prinsippskisse av stempelpumpe [25].

Injektoren i et HPLC-system fører et bestemt volum av prøven inn i strømmen av mobilfasen. Loopinjektorer er de mest vanlige injektorene. Figur 4.5 viser en prinsippskisse av en loopinjektor. Som det vises på figuren er loopinjektoren en seksportsventil. Hvilken retning væskestrømmen ledes, bestemmes av posisjonen til ventilene. Når injektoren er i fyllstilling injiseres prøveløsningen inn i sløyfen. Ved å snu på ventilene blir injektoren i injiserstilling ved at kanalene som leder væskestrømmen flyttes slik at strømmen av mobilfase ledes til sløyfen. Etter endt injisering settes injektoren tilbake til fyllstilling. Før neste injeksjon skylles kanalene med en væskeløsning. Dette er for å fjerne rester av forrige prøveløsning [25].



Figur 4.5: Prinsippskisse av en loopinjektor, A: loopinjektor i fyllstilling, B: loopinjektor i injiser stilling [25].

I autoinjektorer automatiserer man injeksjonen slik at prøveløsningen injiseres i en programmert rekkefølge og etter bestemte tidsintervaller.

Mobilfasen er en av de viktigste delene i et HPLC-system. Det er mobilfasen som bringer prøveløsningen ut av kolonnen. Det er stilt en del krav til mobilfasen. En mobilfase skal ikke gi respons i den detektoren som benyttes i et HPLC-system. Den mest vanlige detektoren i et HPLC-system er UV-detektoren. Det bør brukes løsemidler med lav UV-cutoff-verdi. UV-cutoff er den laveste bølgelengden som kan benyttes sammen med løsemidlet. Urenheter i mobilfasen kan ødelegge kolonnen, derfor er det viktig at man bruker en mobilfase med en tilfredsstillende renhet. Siden mobilfaser med høy viskositet kan øke trykket i et HPLC-system er det ønskelig at man har en mobilfase med lav viskositet. En god mobilfase skal ha lav toksisitet, og den skal ha lav brennbarhet. I tillegg skal mobilfasen ikke være reaktiv og den skal destrueres lett. De kjemiske egenskapene til mobilfasen, det vil si hva slags mobilfase man skal benytte, bestemmes ut i fra hvilke analytter man vil analysere og hvilken type kolonnemateriale man bruker [25].

I omvendt-fase-kromatografi bruker man vandige bufferløsninger, for eksempel 20 mM maursyre. I tillegg bruker man en organisk modifikator som bryter interaksjonen mellom analytt og stasjonærfasen. Jo høyere andel organisk modifikator, jo lavere retensjonstid for analytter. Datamaskinen som er koblet til HPLC-systemet bearbeider analyseresultatene.

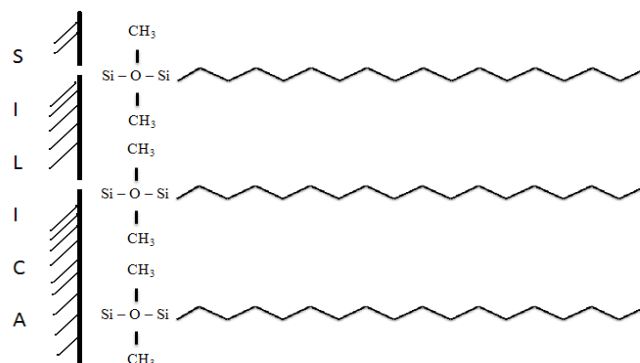
### **4.3.1 Omvendt-fase kromatografi**

Som nevnt over baserer separasjonen i HPLC seg på interaksjon mellom analytt- og kolonnematerialet. Det finnes ulike typer interaksjoner som man kan benytte til å analysere stoffer. I dette arbeidet ble det brukt omvendt-fase kromatografi.

I omvendt-fase kromatografi er stasjonærfasen hydrofob og man får hydrofobe stasjonærfaser ved å binde hydrofobe grupper til silanol gruppene på silika (se figur 4.6).

Stabiliteten av silika-baserte stasjonærfaser påvirkes av pH i mobilfasen. Stabiliteten er best i pH-området 2-8. Den mest brukte hydrofobe fasen er octadecyl, C18. Retensjonen på omvendt-fase kromatografi er basert på hydrofobe interaksjoner mellom analyttene og stasjonærfasen. Hydrofobe interaksjonen er basert på Van der Waalske krefter, og de øker

med molekylstørrelsen [25]. Jo større hydrofobisiteten er, jo sterkere blir retensjonen og dermed blir retensjonstiden lengre.



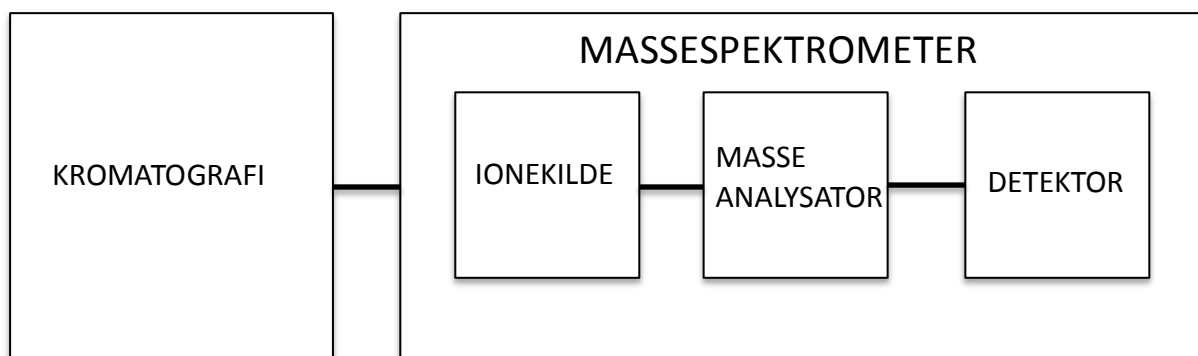
Figur 4.6: Omvendtfase kromatografi med C18-gruppe [26].

## 4.4 Væskekromatografi i kombinasjon med massespektrometri (LC-MS)

LC-MS har store likheter med HPLC – UV, men skiller seg fra HPLC – UV ved at her bruker man et massespektrometer som detektor. Avhengig av kolonnedimensjoner, analyttegenskaper og deteksjonsmodus, kan mobilfasehastigheten og injeksjonsvolumet variere litt.

### 4.4.1 Massespektrometri

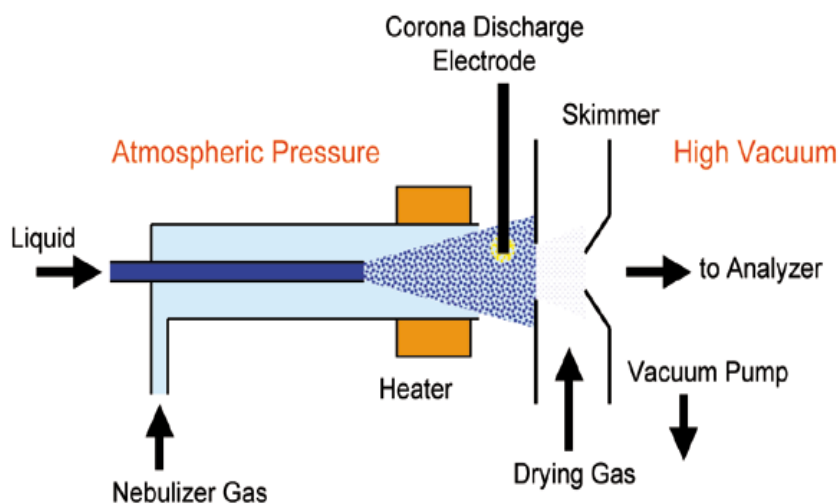
Et massespektrometer består av tre hoveddeler; ionekilde, masseanalysator og detektor (se figur 4.7). For å kunne analysere de stoffene man er interessert i på MS, må disse først passere gjennom en ionekilde som ioniserer stoffene. Etter at stoffene er ionisert leveres de til masseanalysatoren og detekteres ved hjelp av en detektor.



Figur 4.7: Hoveddeler i LC-MS.

En ionekilde ioniserer molekylene og det er bare molekyler med ladning som kan passere masseanalysatoren. Det finnes mange forskjellige ioniseringsmetoder. Elektrospray ionisasjon (ESI), atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon (APCI) og atmosfæretrykk-fotoionisasjon (APPI) er eksempler på ioniseringsteknikker. Valg av en ionekilde er avhengig av egenskapene til de analyttene man ønsker å analysere.

I APCI produseres ioner ved hjelp av koronautlading ved atmosfæretrykk. Væsken fra LC-kolonnen føres inn i massespektrometeret og forstøves ved hjelp av en forstøvergass som for eksempel nitrogengass. Denne væskestrømmen passerer gjennom et oppvarmet (350-500 °C) kapillærrør hvor løsemidlene fordampes fullstendig. Blandingen av vanndamp og gass føres inn i ionekilde med atmosfæretrykk og analyttene ioniseres av en koronautladningsnål og sendes til masseanalysatoren [25, 27]. Mens ESI er godt egnet for molekyler med sterk sure eller basiske egenskaper, er APCI godt egnet for molekyler med lite sure eller basiske egenskaper [28]. Figur 4.8 viser en prinsippskisse av APCI.

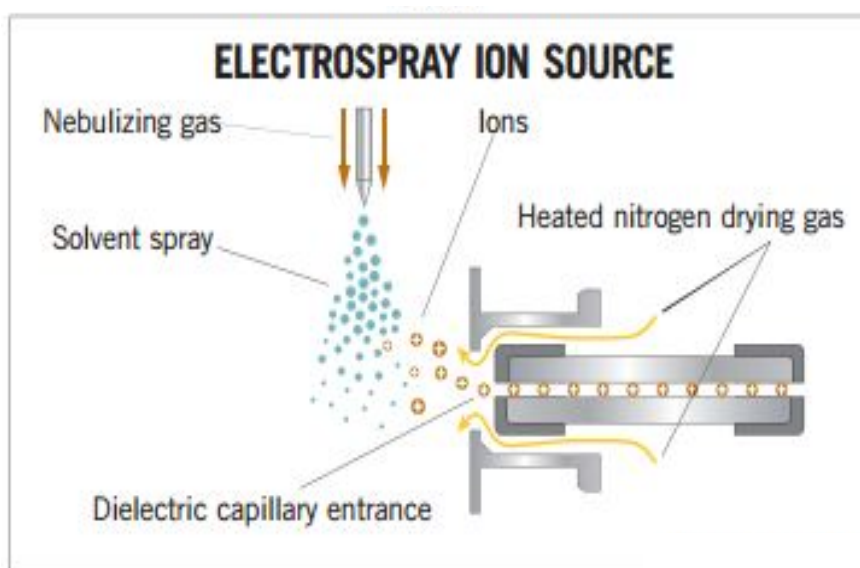


Figur 4.8: Prinsippskisse av APCI [29].

APPI er en ny metode for ionisering av analytter i LC-MS. Mekanismen for APPI er at analyttene blir eksponert for UV-lys fra en lampe. De fotonene som sendes ut fra denne lampen gjør at det skjer enten proton absorpsjon eller elektron fjerning fra molekyler. Dette

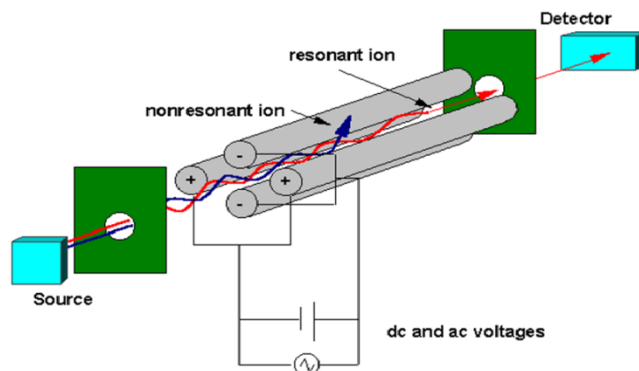
fører til dannelsen av ladede molekyler. APPI er godt egnet for ionisering av upolare komponenter [30].

Når det benyttes ESI som ioniseringskilde i et LC-MS system, føres prøven/mobilfasen inn i massespektrometeret i en væskestrøm som går gjennom et trangt kapillærrør. Ved enden av dette røret forstøves væsken ved hjelp av en nebuliserende gass. Dette fører til dannelsen av små dråper. Det pålegges et elektrisk potensial på disse små dråpene som gjør at de får ladning. Deretter tørkes løsningsmiddelet ved hjelp av en tørkegass fra dråpene som fører til at de blir mindre og mindre [25]. Når dråpene blir mindre og mindre vil man få høyere konsentrasjoner av ladninger som fører til ustabile dråper. Disse dråpene sprekker etterhvert. Denne prosessen fortsetter til man har fått desolvatiserte ladninger som føres videre inn i masseanalysatoren ved hjelp av elektrisk spenning (se figur 4.9) [25, 30]. Masseanalysatoren separerer ladede forbindelser basert på forholdet mellom deres masse og ladning ( $m/z$ ) [30]. Kvadrupol, ionefelle og time of flight er eksempler på noen av de masseanalysatorene som man bruker.



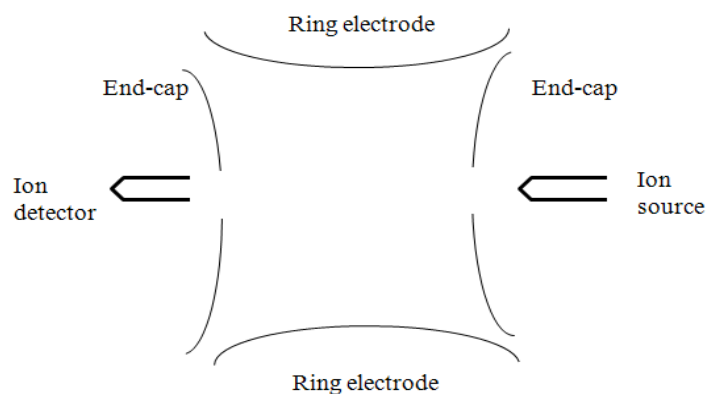
**Figur 4.9: Prinsippskisse av ESI [31].**

I kvadrupol systemet er det fire parallelle metallstenger der det pålegges et elektrisk felt. Ioniserte molekyler passerer gjennom disse stengene etter deres ionemasse. Ved å endre på feltstyrken kan man bestemme hvilke ionemasse skal passere og hvilke skal forbli i ionekilden [25]. Figur 4.10 illustrerer en prinsippskisse av en kvadrupol.



**Figur 4.10: Prinsippskisse av kvadrupol systemet [32].**

I ionefelle masseanalysatorer injiseres prøveløsningen fra for eksempel en væskerkromatografikolonne direkte inn i masseanalysatoren. Som er vist i figur 4.11 består ionefellen av en ringelektrode og to endedeksler (*end-caps*). Injeksjon og deteksjon av ionene styres av disse endedekslene. Det påsettes en elektrisk spenning på ringelektroden som gjør at ioniserte stoffer beveger seg i ionefellen. Ved å endre spenningen kan ioner med gitt masse bringes ut av fellen og sendes til detektoren [25, 33].



**Figur 4.11: Prinsippskisse av ionefelle [33].**

I time of flight (TOF) måles det massen til et ion basert på dets flytid gjennom et feltfritt rør. Prinsippet for TOF er at ionene i masseanalysatoren med ulik masse men med samme kinetisk



energi beveger seg i samme retning. Flyhastigheten til ionene er omvendt proporsjonalt med kvadratroten av  $m/z$ -verdien. Det vil si lettere ioner flyr raskere enn tyngre ioner og detekteres først [25, 34].

Man kan koble to eller flere masseanalysatorer sammen og slike systemer kalles for tandem MS. I dette prosjektet ble det brukt tre masseanalysatorer som er koblet sammen, nemlig trippelkvadrupol. I første kvadrupolen filtreres det de ionene som ønskes å analyseres. Man har muligheten til å velge to eller flere ionemasser. Denne deteksjonsmetoden kalles for multiple reaction monitoring (MRM). Etter at de valgte ionene ble filtrert sendes de til den andre kvadrupolen. Her vil de fragmenteres ved at disse ionene kollideres med gassmolekyler, (collision-induced dissociation (CID)). I den tredje kvadrupolen fokuseres det på bestemte fragmenter som dannes fra ionene. Denne teknikken kalles for single reaction monitoring eller selectiv reaction monitoring (SRM) [25, 33]. MRM sammenlignet med SRM gir lite informasjon av analyttene man er interessert i, da interferensene i prøven kan også ha samme ionemasse. Når man går over til SRM får man mer karakteristisk fragmentering og dermed mer spesifikk informasjon. På denne måten kan man kvantifisere analytter ved svært lave konsentrasjoner.

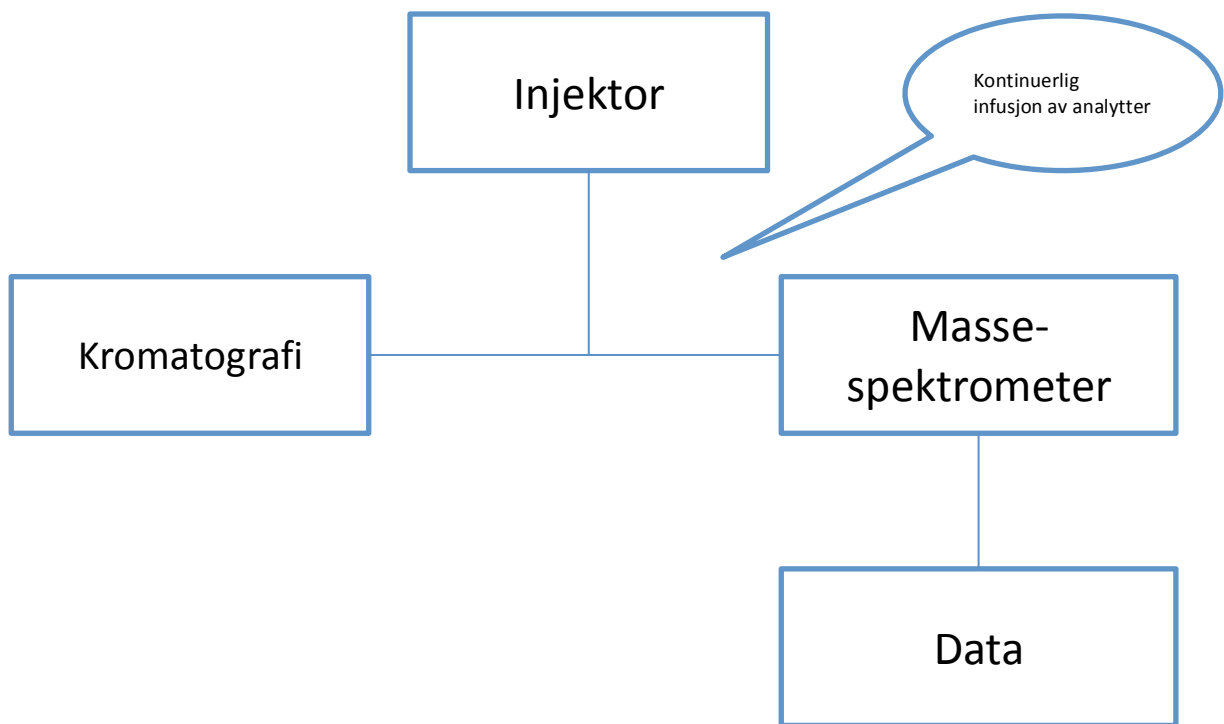
#### **4.4.2 Matrikseffekter i LC-MS**

Matrikseffekt i LC-MS er endret ionisering av analytter i ioniseringskilden på grunn av tilstedeværelse av substanser som eluerer samtidig med stoffer av interesse. Den eksakte mekanismen for matrikseffekten er ukjent, men det er sannsynlig at det skyldes konkurrering mellom en analytt og en ko-eluerende komponent i elektropray grensesnittet [17]. Det har blitt vist gjennom en serie av eksperimenter at matrikseffekter er et resultat av konkurransen mellom ikke-flyktige matrikskomponenter og analytt-ioner for å få tilgang til dråpeoverflaten for overføring til gassfasen [35]. Denne konkurransen mellom analytter og ko-eluerende komponenter kan redusere eller øke ionedannelsen, som er kjent som henholdsvis ionesuppresjon og ionforsterkning [17]. Graden av matrikseffekter avhenger av analyttens egenskaper. De mest polare stoffene er mer følsomme for matrikseffekter sammenlignet med mindre polare stoffer [36].

Tilstedeværelse av matrikseffekter kan ha stor betydning for den analytiske metodens sensitivitet, nøyaktighet og reproduserbarhet [37].

## Vurdering av matrikseffekter

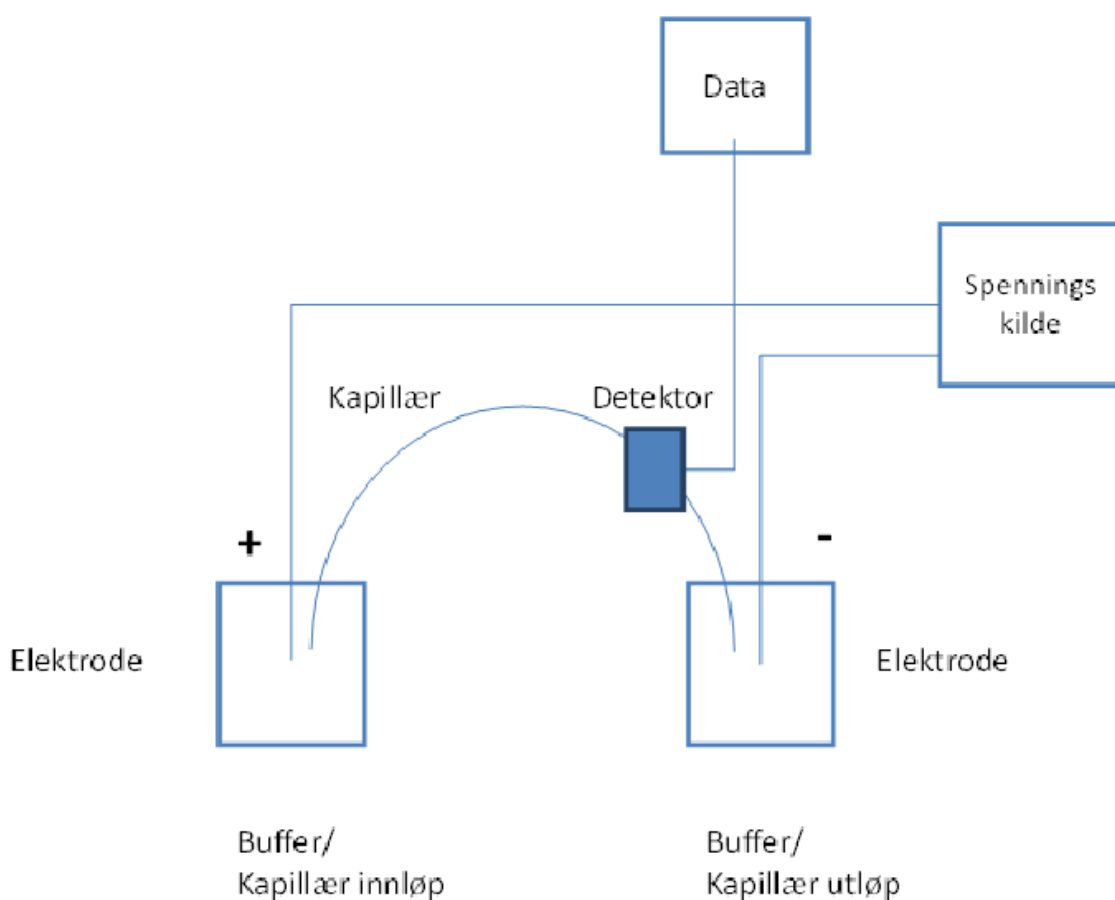
De mest brukte metodene som benyttes for vurdering av matrikseffekter er post-kolonneinfusjon og post-ekstraksjons addisjon [17]. Et postkolonneinfusjon eksperiment involverer at det opparbeides en prøve i den aktuelle matriksen som ikke inneholder modellsubstansen(e). Denne prøven injiseres og separeres på LC-MS-kolonne, og samtidig pumpes det inn en konstant tilførsel av modellanalytter direkte inn i MS kilden, se figur 4.12 [38]. Signalet skal være konstant. En reduksjon i signalet vil tyde på at komponenter i ekstraktet reduserer analyttens ionisasjon. Hvis reduksjonen av signalet sammenfaller med analyttens retensjonstid vil det tyde på at metoden var utsatt for ionesuppresjon. I post-ekstraksjons addisjon sammenligner man signaler fra analytt i et egnet løsningsmiddel med signaler fra analytt som er tilsatt en ekstrahert prøvematriks i samme konsentrasjon [38]. Ut i fra signal forholdet kan man se om det foreligger matrikseffekter.



Figur 4.12: Oppsettet for postkolonneinfusjon

## 4.5 Kapillærelektroforese (CE)

Separasjonen i CE er basert på stoffenes ulike vandringshastighet i et pålagt elektrisk felt. Migrasjonen av stoffene er avhengig av stoffenes molekylstørrelse og ladning. Små molekyler vandrer raskere enn større molekyler. Molekyler med flere ioniserte grupper, som da har mer ladning, vandrer raskere enn molekyler med mindre ladning. Figur 4.13 representerer en prinsippskisse for CE.



**Figur 4.13: Prinsippskisse for CE**

Separasjonen skjer i kapillæret. Det har en indre diameter på 50 eller 75  $\mu\text{m}$  og en lengde på 30-70 cm og er fylt med en buffer. Det injiseres små volum av prøven inn i kapillærinnløpet. Etter injeksjonen føres kapillærendene ned i hver sitt buffer-reservoar. Deretter pålegges det en høyspenning (10- 30 kV) som fører til vandring av molekyler som er ladet. UV- detektoren som er plassert i nærheten av kapillærutløpet registrerer stoffer som passerer til enhver tid [25].

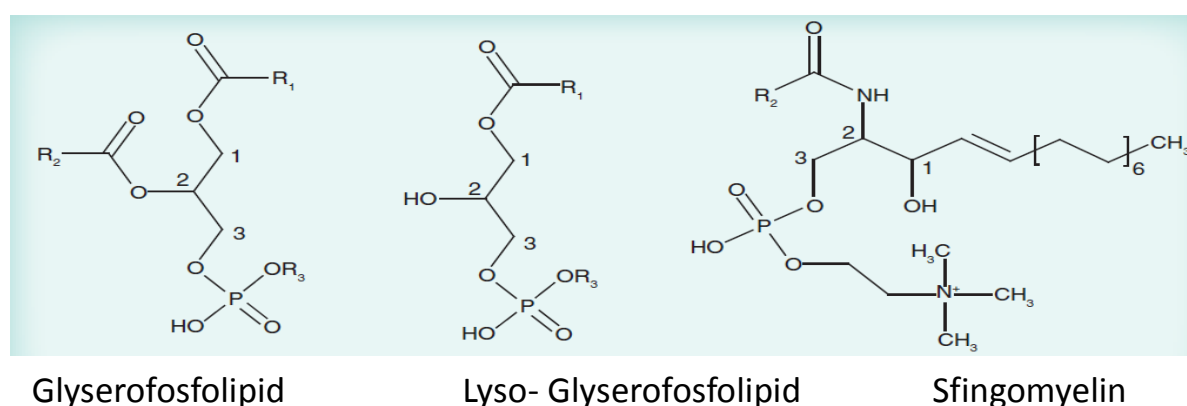
### 4.5.1 Indirekte UV-deteksjon med CE

Indirekte UV-deteksjon brukes til kvantitativ og kvalitativ analyse av ioner som  $Na^+$  og  $Cl^-$ . Disse ionene mangler UV-absorbans. I indirekte UV-deteksjon har man UV-absorberende ioner i bufferen som gir et høyt bakgrunnssignal. Når ioner uten UV-absorbans passerer detektoren får man en kortvarig reduksjon av UV-absorbansen, og dette registreres som signal [39, 40].

## 4.6 Prøve matrix

I dette arbeidet ble plasma brukt som en biologisk matriks. Plasma har en kompleks sammensetning. Den består av vann, proteiner (albumin, globuliner osv.), uorganiske salter, lipider, enzymer, hormoner, vitaminer og karbohydrater. Hovedfokuset har vært å påvise at PALME-ekstraktene var frie for disse endogene komponenter, og det ble særlig lagt vekt på fosfolipider og uorganiske ioner som  $Na^+$  og  $Cl^-$ .

Fosfolipider er stoffgruppen som er sammensatt av ester eller amid derivater av glyserol eller sfingosin med fettsyrer eller fosfoser [12]. Disse stoffene er involvert i mange biologiske transportprosesser og er de viktigste bestanddelene i cellemembraner [13]. Det finnes to vanlige strukturelle klasser av fosfolipider; glyserofosfolipider og sfingomyeliner (SM), (se figur 4.14). Lysoglyserofosfolipid mangler en ester gruppe sammenlignet med glyserofosfolipider [18]. De mest vanlige fosfolipidene som finnes i humant plasma med avtagende konsentrasjoner er fosfatidylkolin (PC), sfingomyeliner (SM), fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylinositol (PI), fosfatidylserin (PS) og fosfatidylglyserol (PG) [13, 41].

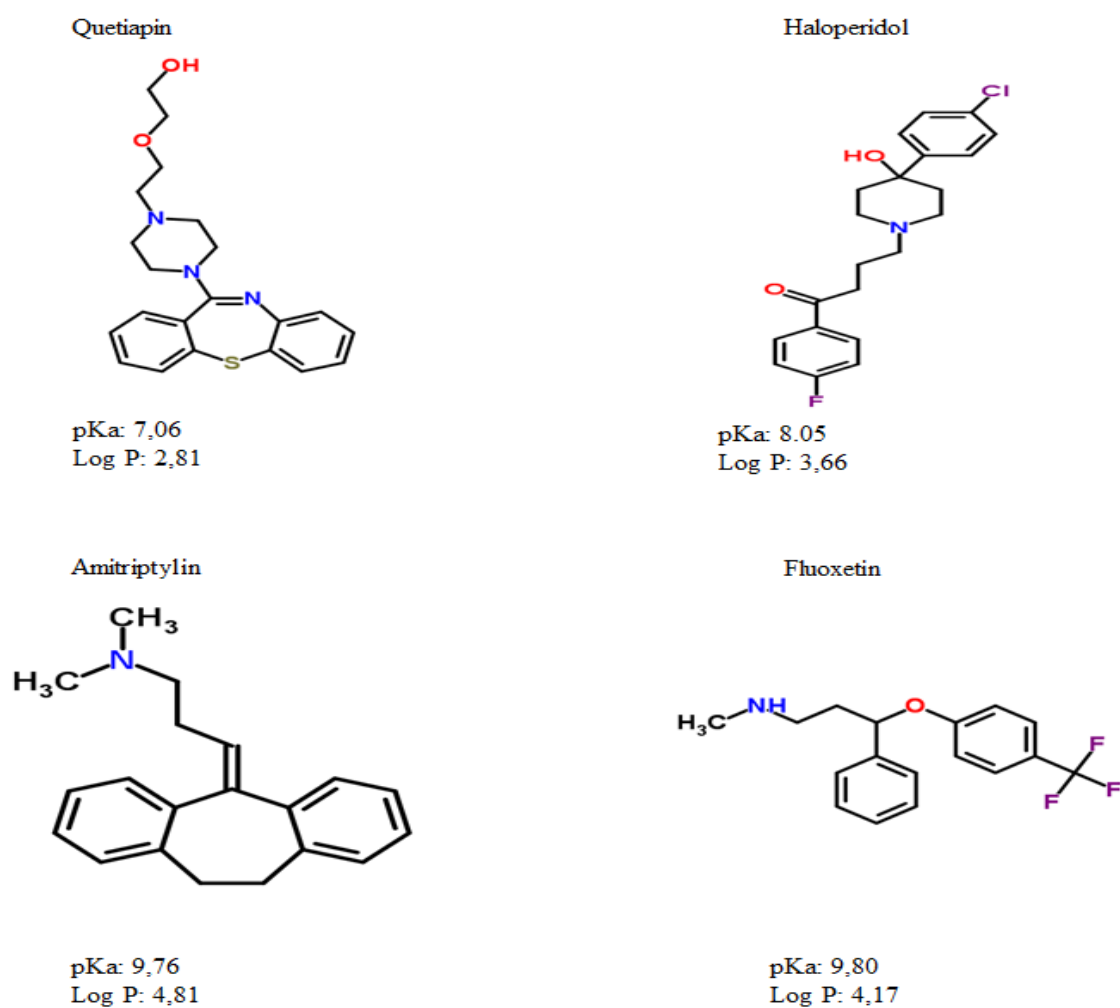


Figur 4.14: Kjemisk struktur av vanlige fosfolipider [13].

# 5 EKSPERIMENTELT

## 5.1 Valg av modellanalytter

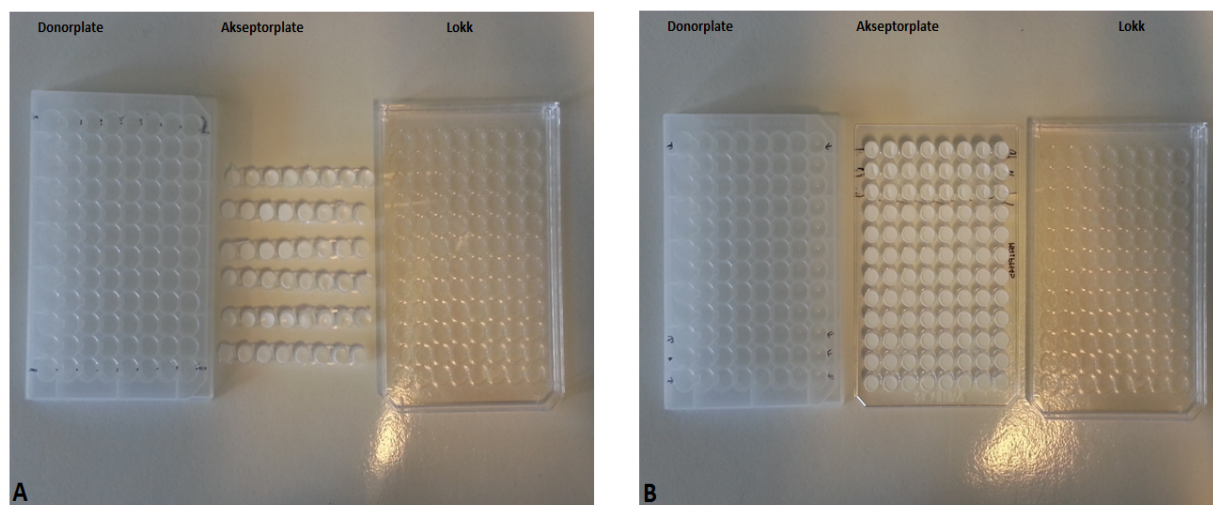
Stoffene som ble brukt som modellanalytter i dette prosjektet var basiske antidepressive og antipsykotika legemidler. Figur 5.1 viser molekylstruktur og kjemiske egenskaper til de utvalgte modellanalyttene. Disse modellanalyttene ble valgt for å frembringe data som var sammenlignbare med tidligere arbeid [9, 20, 22, 23, 42, 43].



Figur 5.1: Molekylstrukturene og kjemiske egenskapene til modellanalyttene [44, 45].

## 5.2 Utstyr og fremgangsmåte for PALME

I dette prosjektet ble det brukt to akseptorplater for PALME. Disse platene er basert på to forskjellige membraner, nemlig polyvinylidenfluorid (PVDF) og polypropylen (PP). PVDF-baserte akseptorplater, MAIPN4550 96-well MultiScreen-IP Filter Plate med 0,45  $\mu\text{m}$  porestørrelse og 6 mm indrediameter (Millipore, Billerica, MA, USA) er kommersielt tilgjengelig og brukes hovedsakelig til permeabilitets studier [46]. PP-baserte akseptorplater er ikke kommersielt tilgjengelige. Derfor ble det brukt "hjemmelaget" PP-baserte akseptorvegger. Disse ble laget ved å forsegle en sirkulær del av en Accurel flat membran (Membrana, Wuppertal, Tyskland) med 100  $\mu\text{m}$  tykkelse og 0,1  $\mu\text{m}$  porestørrelse til hver av de åtte plast-vialer fra Thermo Scientific (Loughborough, UK) ved hjelp av en varmekilde ved 240 °C. Etter forseglingen ble nedre delen av vialene kuttet og øvre delen ble brukt som akseptorreservoar. En polypropylen plate med 96-brønner og kapasitet til 0,5 ml væske i hver brønn fra Agilent (Santa Clara, CA, USA) ble brukt som donorplate. Figur 5.2 viser bilder av viser ekstraksjonsenheten i PALME.



**Figur 5.2:** Bilder av ekstraksjonsenheten i PALME, A: Ekstraksjonsenhet med ``hjemmelaget`` akseptorplater. B: Ekstraksjonsenhet med akseptorplate som er kommersielt tilgjengelige.

Hver brønn i donorplaten ble fylt med 250  $\mu\text{l}$  prøveløsning. Deretter ble det pipettert inn 2.5  $\mu\text{l}$  av et organisk løsningsmiddel, som ikke er blandbart med vann, i hvert enkelt membranfilter. Dette organiske løsningsmiddelet dannet en kunstig væskemembran i filteret. Etter ett minutt ble overskuddet av organisk løsningsmiddel tørket av med en ansiktsserviett (VWR International, Leuven, Belgia). Øvre delen av hvert membranfilter har et væskereservoar. Disse væskereservoarene ble fylt med 50  $\mu\text{l}$  20 mM maursyre som

akseptorløsning. Donorplaten og akseptorplaten ble trykt sammen og hele enheten ble satt på et ristebrett av typen Vibramax 100 agitator (Heidolph, Kelheim, Tyskland) og risting ved 1200 rpm ble utført. Etter endt ekstraksjon ble akseptorløsningen overført til en autosampler vial og ble analysert på HPLC, LC-MS eller CE.

## 5.3 Kjemikalier

Tabell 5.1 viser oversikt over kjemikalier som er brukt i dette arbeidet.

**Tabell 5.1:** Oversikt over kjemikalier

Kjemikalier	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril , $C_2H_3N$	LC-MS-kvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid, KCl	> 99,5 %	Sigma-Aldrich, Strinheim, Tyskland
Maursyre, $HCOOH$	$\approx$ 98 %, MS-kvalitet	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Metanol, $CH_3OH$	$\geq$ 99,0 %, LC-MS-kvalitet	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumklorid, NaCl	> 99,5 %	Sigma-Aldrich, Strinheim, Tyskland
Amitryptilin HCl	Renstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Etanol	96 %	Arcus, Oslo, Norge
Orto-fosforsyre	Pro analysi 85 %	E. Merck, Darmstadt, Tyskland
Quetiapin	Renstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fluoxetin HCL	Renstoff	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Haloperidol	Renstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vann	Ionebyttet	Milli-Q water purification system, Molsheim, Frankrike
TTAB	Renstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumkromat	Renstoff	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Imidazol	Renstoff	Sigma-Aldrich, Strinheim, Tyskland

## **5.4 Løsninger**

### **5.4.1 Stamløsninger**

Rentstoff av modellanalyttene quetiapin, haloperidol, amitriptylin og fluoksetin ble enkeltvis blandet med 96 % etanol i konsentrasjoner på 1 mg/ml og lagret ved 4 °C, beskyttet mot lys.

### **5.4.2 Standardløsninger**

Standardløsninger ble laget ved å fortynne stamløsningene med 20 mM maursyre slik at konsentrasjonen av hver analytt ble 5 µg/ml. Standardløsningene ble laget ukentlig og lagret ved 4 °C, beskyttet mot lys.

### **5.4.3 Donorfaser**

Det ble laget nye donorfaser for hvert forsøk. Tre ulike donorfaser ble brukt i dette prosjektet. For måling av utbytter av analyttene ble spiket plasma og spiket vandig NaOH-løsning brukt som donorfase. For måling av utbytter av analytter fra biologiske væsker ble plasma spiket med stamløsningene slik at konsentrasjonen av hver analytt ble 2 µg/ml. Deretter ble plasma fortynnet med 40 mM vandig NaOH-løsning i forholdet 1:1. For måling av utbytter av analytter fra vandig NaOH-løsning ble 40 mM NaOH-løsning spiket med stamløsningene slik at konsentrasjonen av hver analytt ble 2 µg/ml. Deretter ble NaOH-løsningen fortynnet med rensset vann i forholdet 1:1.

For å evaluere renheten til PALME-ekstrakter ble blank plasma blandet med 40 mM vandig NaOH i forholdet 1:1.

### **5.4.4 Akseptorfase**

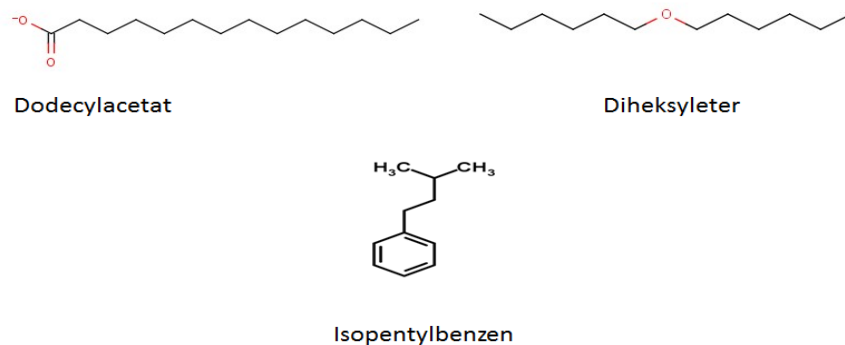
20 mM maursyre ble brukt som akseptorfase i hele prosjektet. Denne ble laget ved å fortynne 377 µl maursyre av LC-MS kvalitet med rensset vann til 500 ml.

### **5.4.5 Organiske faser**

Det ble benyttet tre forskjellige organiske løsningsmidler som væskemembran i dette arbeidet. Disse løsningsmidlene er hverken blandbare med vann eller flyktige, og danner dermed en



stabil kunstig væskemembran. Figur 5.3 viser molekylstrukturen til de organiske løsningsmidlene som ble brukt.



Figur 5.3: Molekylstruktur av organiske løsningsmidler [44].

#### 5.4.6 Mobilfaser til HPLC og LC-MS/MS

Mobilfase A ble laget ved å blande 20 mM maursyre med acetonitril i forholdet 95:5 (v/v).

Mobilfase B ble laget ved å blande 20 mM maursyre med acetonitril i forholdet 5:95 (v/v).

#### 5.4.7 Andre løsninger

Standardløsning for kvantitativ evaluering av matrikseffekter i LC-MS ble laget ved å fortynne stamløsninger med 20 mM maursyre slik at sluttkonsentrasjoner av modellanalyttene quetiapin, fluoxetin, amitriptylin og haloperidol ble henholdsvis 1 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml og 0,1 µg/ml.

For måling av Na<sup>+</sup> ioner ved kapillærelektroforese med indirekte UV-deteksjon ble 0,0422 g imidazol løst i 20 ml 20 mM maursyre. Deretter ble denne løsningen fortynnet med rensset vann til 100 ml. Denne løsningen ble brukt som separasjonsbuffer i kapillærelektroforese.

For måling av Cl<sup>-</sup> ioner ved kapillærelektroforese med indirekte UV-deteksjon ble 5 mM KCrO<sub>4</sub> med 0,5 mM TTAB løsning brukt som separasjonsbuffer.

KCl og NaCl ble brukt som eksterntstandarder for kapillærelektroforese med indirekte UV-deteksjon av Na<sup>+</sup> og Cl<sup>-</sup> ioner. Disse eksterntstandardene ble laget ved å løse 0,0333 g KCl i

500 ml renset vann. Deretter ble 0,0064 g NaCl overført til en målekolbe med kapasitet til 100 ml og tilsatt KCl-løsning til 100 ml.

For å lage 4 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  i vann ble 1 ml 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt, Tyskland) fortynnet til 21,25 ml med renset vann.

5 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  i metanol ble laget på følgende måte;

5 ml ammoniakkopløsning, konsentrert, ble tilsatt 95 ml metanol

Ved å fortynne høykonsentrert NaOH-løsning (1 M) ble det laget 40 mM NaOH-løsning.

1 M NaOH ble laget ved å løse 39,99 g NaOH i 1 L renset vann.

Det ble ikke laget nye buffere for CE-målinger. I stedet ble det brukt det som var laget fra før av. Følgende buffere ble brukt;

Basisk-buffer: borat buffer pH 9,5

Sur-buffer: fosfat buffer pH 2,5

Nøytral-buffer: fosfat buffer pH 7

## 5.5 Prøveopparbeidelse

### 5.5.1 Ekstraksjonsprosedyrer

For å beregne ekstraksjonsutbytter av modellanalyttene med PALME som prøveopparbeidelsesmetode ble både humant plasma (Oslo universitetssykehus, Oslo, Norge) og 40 mM vandig NaOH-løsning brukt som prøvematriks. Ekstraksjonsutbytter av analyttene ble målt både med PVDF- og PP-membran baserte akseptorplater. Ekstraksjonen ble utført etter følgende oppsett;

1. Stamløsninger av hver enkel analytt ble fortynnet med plasma eller 40 mM vandig NaOH-løsning slik at sluttkonsentrasjonen av hver modellanalytt ble 2  $\mu\text{g/ml}$ .

2. Spiket plasma ble ristet med Vibramax 100 agitator (Heidolph, Kelheim, Tyskland) ved 1200 rpm i 15 minutter. Dette steget var ikke nødvendig med vandig NaOH-løsning som prøvematriks.
3. Spiket plasma eller vandig NaOH-løsning ble fortynnet med 40 mM vandig NaOH-løsning eller rensset vann i forholdet 1:1.
4. Fortynnet plasma eller NaOH-løsning ble ristet med Vibramax 100 agitator (Heidolph, Kelheim, Tyskland) ved 1200 rpm i 5 minutter.
5. Hver brønn i donorplaten ble fylt med 250 µl prøvematriks.
6. Det ble pipettert 2.5 µl organisk løsningsmiddel inn i hvert enkelt membranfilter på akseptorplaten/reservoaret.
7. Etter ett minutt ble overskuddet av organisk løsningsmiddelet tørket av med en ansiktsserviett (VWR International, Leuven, Belgia) .
8. Væskereservoaret over membranfilteret ble fylt med 50 µl 20 mM maursyre.
9. Donorplaten og akseptorplaten/veggen ble trykt sammen og satt på et ristebrett av typen Vibramax 100 agitator (Heidolph, Kelheim, Tyskland) og ble ristet ved 1200 rpm i 30 minutter.
10. Etter endt ekstraksjon ble hvert ekstrakt overført til en autosampler vial.

For å se på hvor rene PALME-ekstraktene var, ble det gjort en del forsøk. Disse forsøkene utgjorde kvalitative og kvantitative målinger av matrikseffekter, monitorering av fosfolipider og ioner i PALME-ekstrakter. Ekstraktene fra SPE og PPE ble sammenlignet med PALME-ekstrakter. Prøveopparbeidelsene for disse forsøkene ble gjennomført etter følgende oppsett;

**PPE:**

1. Blank humant plasma ble fortynnet med acetonitril i forholdet 1:2 (v/v).
2. Fortynnet plasma ble satt på et ristebrett av typen Vibramax 100 agitator (Heidolph, Kelheim, Tyskland) og ble ristet ved 1200 rpm i 10 minutter.

3. Blandingen ble sentrifugert på Eppendorf Centrifuge 5804 (Hamburg, Tyskland) ved 10000 rpm i 10 minutter.
4. Supernatanten ble filtrert gjennom et sprøytefilter av typen Minisart RC 25 (Goettingen, Tyskland) med 0,45 µm porestørrelse.

#### **SPE:**

1. SPE-kolonnen Oasis MCX med 10 mg sorbent (Waters Corporation, Milford, MA, USA) ble kondisjonert med 500 µl metanol og 500 µl renset vann.
2. 500 µl humant plasma fortynnet med 500 µl 4 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i vann ble påsatt kolonnen.
3. Kolonnen ble først vasket med 500 µl 2 % maursyre i vann og deretter med 500 µl metanol.
4. Prøven ble eluert ut med 300 µl (150 µL x 2) 5 % NH<sub>4</sub>OH i metanol.
5. Eluatet ble dampet inn til tørrhet under nitrogen ved 60 °C.
6. Prøven ble reløst i 200 µl mobilfase A.

#### **PALME:**

Fremgangsmåten som ble brukt til undersøkelse av ekstraksjonsutbytter med PALME ble også brukt til vurdering av PALME-ekstraktenes renhet. I dette tilfelle ble det brukt legemiddelfritt humant plasma, ellers var ekstraksjonsprosedyren identisk.

## **5.6 Betingelser for analyse**

I dette arbeidet ble det brukt tre forskjellige analysemetoder, nemlig HPLC, LC-MS/MS og CE.

### **5.6.1 HPLC-betingelser**

HPLC med UV-detektor ble brukt for å beregne ekstraksjonsutbytter av modellanalyttene fra biologisk prøve og 20 mM NaOH-løsning. Prinsippet for HPLC er beskrevet i seksjon 4.3. Tabell 5.2 og 5.3 viser en oversikt over parameterne for oppsettet av HPLC-systemet for

metoden som er brukt i dette prosjektet. Instrumentet som ble brukt i forsøkene var av typen Dionex Ultimate 3000 system med degasser (SRD-3200), pumpe (HPG-3200M), autosampler (WPS-3000SL), kolonneovn (FLM-3100), UV-detektor (VWD-3400), alt fra Dionex Corporation (Sunnyvale, CA, USA). Data-innsamlingen og behandlingen av disse ble gjennomført med Chromeleon (v. 6.80 SP2 Build 2212) software (Dionex).

**Tabell 5.2:** Kromatografiske parametere for HPLC-metoden

<b>Mobilfase A</b>	5 % C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N, 95% 20 mM HCOOH (v/v)
<b>Mobilfase B</b>	95 % C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N, 5% 20 mM HCOOH (v/v)
<b>Kolonne</b>	Gemini, C18, 150x2 mm, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
<b>Injeksjonsvolum</b>	20 µl
<b>Flow</b>	0,4 ml/min
<b>Deteksjonsbølgelengde</b>	UV-deteksjon, 214 nm

**Tabell 5.3:** Gradient brukt i HPLC-metoden.

<b>Retensjonstid (min)</b>	<b>Mengde mobilfase B (%)</b>
<b>0</b>	0
<b>11</b>	40
<b>11,1</b>	75
<b>14,4</b>	75
<b>14,5</b>	0
<b>22</b>	0

### 5.6.2 LC-MS/MS-betingelser

LC-MS ble brukt for monitorering av fosfolipider og for kvantitativ og kvalitativ evaluering av matrikseffekter i LC-MS. Prinsippene for LC-MS er beskrevet i seksjon 4.4. Det ble brukt to forskjellige masseanalysatorer; for evaluering av matrikseffekter ble det brukt lineær ionefelle som masseanalysator og for monitorering av fosfolipider ble det brukt trippelkvadrupol. I tabell 5.4 – 5.9 vises det en oversikt over parameterne for oppsettet av LC-MS/MS-systemet for de metodene som er brukt. Instrumentet som ble benyttet i forsøkene for evaluering av matrikseffekter i LC-MS var av typen Dionex Ultimate 3000 bestående av en WPS 3000 TSL autosampler, en LPG 3300 pumpe og en SRD 3300 degasser koblet til en Thermo Scientific LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer (alt fra Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA). For monitorering av fosfolipider ble det brukt samme kromatografisk

instrument, men som masseanalysator ble det benyttet trippelkvadrupol (TSQ quantum access) fra Thermo Scientific. Data-innsamlingen og behandlingen av disse ble gjennomført med Xcalibur software version 2.1 fra Thermo Scientific.

**Tabell 5.4:** Gradient brukt i LC-MS-metoden for kvantitativ analyse av matrikseffekter i LC-MS

Retensjonstid (min)	Flow (µl/min)	Mengde mobilfase B (%)
0	50	0
1	50	15
11	50	30
20	50	30
20.1	100	90
30	100	90
30.1	100	0
45	100	0

**Tabell 5.5:** Gradient brukt i LC-MS-metoden

Retensjonstid (min)	Flow (µl/min)	Mengde mobilfase B (%)
0	50	5
25	50	95
30	50	95
33	50	5
40	50	5
45	100	5
50	50	5

**Tabell 5.6:** Gradient brukt i LC-MS-metoden

Retensjonstid (min)	Flow (µl/min)	Mengde mobilfase B (%)
0	45	5
25	45	95
30	45	95
33	45	5
40	45	5
45	100	5
50	45	5

**Tabell 5.7:** MS-parametere for LC-MS-metoden (Trippelkvadrupol)

<b>Ionisering</b>	<b>ESI positive mode</b>	
<b>Kapillærtemperatur</b>	270 °C	
<b>Sheath gas</b>	Nitrogen (N <sub>2</sub> )	
<b>Sheath gas pressure</b>	10 mTorr	
<b>Tørkegass</b>	Nitrogen (N <sub>2</sub> )	
<b>Tørkegasshastighet</b>	5-10 L/min	
<b>Kildespenning</b>	4 kV	
<b>Kollisjonsgass</b>	Argon	
<b>Kollisjonsgasstrykk</b>	1,5 mTorr	
<b>Scanintervall</b>	1,0 sek	
<b>m/z-overganger</b>	Quetiapin	384,16 → 253,01
	Amitriptyline	278,17 → 233,05
	Haloperidol	376,12 → 164,97
	Fluoxetin	310,05 → 147,94

**Tabell 5.8:** Kromatografiske parametere for LC-MS-metoden

<b>Mobilfase A</b>	<b>5 % C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N, 95% 20 mM HCOOH (v/v)</b>
<b>Mobilfase B</b>	<b>95 % C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N, 5% 20 mM HCOOH (v/v)</b>
<b>Kolonne</b>	Gemini, C18, 150x1 mm, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
<b>Injeksjonsvolum</b>	5 µl

**Tabell 5.9:** MS-parametere for LC-MS-metoden (ionefelle)

<b>ESI-mode</b>	<b>Positiv</b>
<b>Forstøvergass</b>	Nitrogen (N <sub>2</sub> )
<b>Forstøvergass hastighet</b>	20 arbitrære enheter (Finnigan)
<b>Kildespenning</b>	4,5 kV
<b>Linsespenning</b>	10 V
<b>Kapillærspenning</b>	34 V
<b>Kapillærtemperatur</b>	200 °C

### 5.6.3 CE-betingelser

I dette prosjektet ble CE brukt for undersøkelse av ekstraktenes renhet med tanke på små ioner i biologiske væsker. Prinsippene for CE er beskrevet i seksjon 4.5. Det ble brukt både

direkte og indirekte UV-deteksjon. Tabell 5.10 og 5.11 viser en oversikt over parameterne for oppsettet av CE systemet for de metodene brukt i dette prosjektet.

**Tabell 5.10:** Betingelser for CE

<b>Spenning</b>	<b>30,00 kV</b>
<b>Strøm</b>	50-100 mA
<b>Deteksjonsbølgelengde</b>	200 nm
<b>Trykk ved injeksjon</b>	50,0 mbar
<b>Separasjonsbuffer</b>	Fosfatbuffer pH 2,5 / Fosfatbuffer pH 7/ Boratbuffer pH 9,5
<b>Injeksjonstid</b>	5 sekunder
<b>Kassettemperatur</b>	25 °C

**Tabell 5.11:** Betingelser for CE med indirekte UV-deteksjon

	<b>Kationer</b>	<b>Anioner</b>
<b>Kapillær ("fused silica")</b>	100 $\mu\text{m}$ $\times$ 27 cm	75 $\mu\text{m}$ $\times$ 57 cm
<b>Skylling med elektrolytt</b>	2 min	1 min
<b>Elektrolytt</b>	6 mM imidazol med 4 mM maursyre	5 mM kromat med 0,5 mM TTAB
<b>Deteksjonsbølgelengde</b>	Indirekte ved 214 nm	Indirekte ved 254 nm
<b>Spenning</b>	+5 kV	- 15 kV
<b>Temperatur</b>	25 °C	25 °C

Instrumentet som ble brukt i forsøkene var av typen Agilent Capillary Electrophoresis System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) koblet til en UV-detektor. Data-innsamlingen og behandlingen av disse ble gjennomført med Agilent ChemStation program (Agilent Technologies). Separasjonen skjedde på et fused-silica kapillær med et indre diameter på 75  $\mu\text{m}$  og effektiv lengde på 55 cm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA).

## 5.7 Beregning av ekstraksjonsutbytter

For å se hvor effektiv PALME teknikken var, ble det gjort en studie hvor ekstraksjonsutbytter av modellanalyttene quetiapin, amitriptylin, fluoxetin og haloperidol fra plasma og vandig NaOH-løsningene ble undersøkt. Både PVDF- og PP-membran baserte akseptorplater ble



testet. Ekstraktene ble laget etter standard oppsettet som er beskrevet i seksjon 5.5.1. Alle de tre forskjellige væskemembranene ble undersøkt. Ekstraktene ble analysert på HPLC i følge betingelsene oppgitt i seksjon 5.6.1. Topparealet av modellanalyttene i ekstraktene ble sammenlignet med topparealet av modellanalyttene i standardløsningen. Det ble laget åtte paralleller av hver enkel væskemembran.

Ekstraksjonsutbytter av analytter ble beregnet basert på følgende formel

$$\text{Utbytte \%} = \frac{n_a}{n_s} \times 100 \% = \frac{V_a C_a}{V_s C_s} \times 100 \%, \quad (5)$$

der  $n_a$  er stoffmengden i akseptorløsningen etter endt ekstraksjon,  $n_s$  er stoffmengden i donorløsningen før ekstraksjon,  $V_a$  og  $C_a$  er volum og konsentrasjon av analytt i akseptorløsningen etter endt ekstraksjon,  $V_s$  og  $C_s$  er volum og konsentrasjon av analytt i donorløsningen før ekstraksjon.

## 5.8 Evaluering av PALME-ekstraktenes renhet

### 5.8.1 Monitorering av UV-absorberende komponenter

UV-absorberende komponenter i PALME-ekstraktene fra humant plasma ble gjennomført med HPLC. For å se om det var noen UV-absorberende komponenter i ekstraktene ble plasma-ekstrakter sammenlignet med vandig NaOH ekstrakter. Både PVDF- og PP-membran-baserte PALME-ekstrakter ble monitorert for UV-absorberende komponenter. Betingelsene for HPLC er oppgitt i seksjon 5.6.1. PALME ekstrakter fra alle de tre forskjellige væskemembraner ble analysert. Ekstraksjonen ble utført i følge seksjon 5.5.1.

### 5.8.2 Monitorering av små ioner i PALME-ekstrakter

Siden humant plasma inneholder små mengder av kationer og anioner ble det gjort en studie der tilstedeværelse av ioner i PP-baserte PALME-ekstrakter ble undersøkt. Det ble gjort målinger på ekstraktenes ledningsevne. Ved å sammenligne blankt PALME-ekstrakt med blank akseptorfase ble ekstraktenes ledningsevne målt. Hele kapillæret i CE apparatet ble fylt med løsningene som skulle analyseres. Det ble pålagt en spenning på 10 kV og strømstyrken ble målt ved 10 kV. Strømstyrken som man måler er proporsjonalt med prøvens ledningsevne. Først ble det pålagt en elektrisk spenning på blank akseptorfase. Strømstyrken ble registrert.

Samme spenning ble deretter lagt på blankt PALME-ekstrakt og strømstyrken ble registrert. Resultatene ble sammenlignet med hverandre. En økning i ledningsevnen ville tyde på at ekstraktene ikke var frie for uønskede ioner. I tillegg ble det gjort både direkte UV-deteksjon av UV-absorberende stoffer og indirekte UV-deteksjon av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  ioner. Betingelsene for CE er oppgitt i seksjon 5.6.3. PALME-ekstrakter fra alle de tre forskjellige væskemembranene ble analysert for små ioner. Ekstraksjonene ble utført i følge seksjon 5.5.1.

### 5.8.3 Monitorering av fosfolipider

Blanke plasma-prøver ble ekstrahert ifølge standardoppsettene i seksjon 5.5.1, og analysert med LC-MS/MS i SRM mode. LC-MS/MS betingelsene er oppgitt i seksjon 5.6.2. De monitorerte fosfolipidene er oppsummert i tabell 5.12. Både SPE, PPE og PALME-ekstrakter som er basert på PVDF- og PP-membraner ble analysert.

**Tabell 5.12:** Oversikt over de monitorerte fosfolipider og undersøkte masseoverganger

<b>Lyso-phosphatidylcholine</b>	496,1 → 184,1
<b>Lysophosphatidylcholine</b>	524,5 → 184,1
<b>Phosphatidylcholine</b>	758,5 → 184,1
<b>Phosphatidylcholine</b>	760,5 → 184,1
<b>Plasmalogen PC</b>	772,6 → 184,1
<b>Lysophosphatidylethanolamine</b>	454,3 → 313,3
<b>Lysophosphatidylserine</b>	524,3 → 339,3
<b>Spingomyelin</b>	731,6 → 184,1
<b>Phosphatidylcholine</b>	758,5 → 184,1
<b>Phosphatidylcholine</b>	804,0 → 184,0
<b>Lyso-phosphatidylcholine</b>	520,7 → 184,2
<b>Lyso-phosphatidylcholine</b>	522,6 → 184,2
<b>Phosphatidylcholine</b>	782,7 → 184,2
<b>Phosphatidylcholine</b>	786,7 → 184,0
<b>Phosphatidylcholine</b>	806,0 → 184,2
<b>Lysophosphatidylglycerol</b>	513,2 → 341,2
<b>Phosphatidylcholine</b>	704,0 → 184,0
<b>Phosphatidylethanolamine</b>	768,6 → 627,5
<b>Phosphatidylcholine</b>	784,0 → 184,0
<b>Phosphatidylcholine</b>	808,0 → 184,0

## 5.8.4 Evaluering av matrikseffekter i LC-MS

### Postkolonneinfusjon

Blank plasma ble ekstrahert ifølge seksjon 5.5.1 og analysert med LC-MS. En løsning med modellanalyttene amitriptylin, quetiapin, fluoxetin og haloperidol med konsentrasjon på 20 ng/ml ble injisert postkolonne med en pumpe som er innebygd i MS-apparatet og med en flow-hastighet på 45 µl/min direkte inn i massespektrometeret. Et konstant signal fra MS ville tyde på at ekstraktene var frie for fosfolipider og at det er ingen matrikseffekter i LC-MS. En økning i signalet fra MS ville bety at det var en ionforsterkning, og en reduksjon ville tyde på en ionesuppresjon.

### Kvantitativ måling av matrikseffekter i LC-MS

Blank humant plasma ble ekstrahert ifølge seksjon 5.5.1. Etter endt ekstraksjon ble 90 µl av PALME-ekstraktene spiket med 10 µl løsning av modellanalyttene amitriptylin, quetiapin, fluoxetin og haloperidol med konsentrasjoner henholdsvis på 1 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml og 0,1 µg/ml. For å se om det er potensiell ionesuppresjon ble spiket plasma-ekstrakter sammenlignet med 90 µl akseptorløsning spiket med 10 µl løsning av modellanalyttene.

Det ble analysert seks paralleller av hver væskemembran, altså seks paralleller av ekstrakter som ble ekstrahert gjennom diheksyleter, dodecylacetat og isopentylbenzen. Hver parallell av væskemembran ble sammenlignet med sin tilsvarende akseptorløsning. Dvs. totalt ble det laget 18 spiket akseptorløsninger, seks spiket diheksyleter ekstrakt, seks spiket dodecylacetat ekstrakt og seks spiket isopentylbenzen ekstrakt.

## 5.9 Q-test

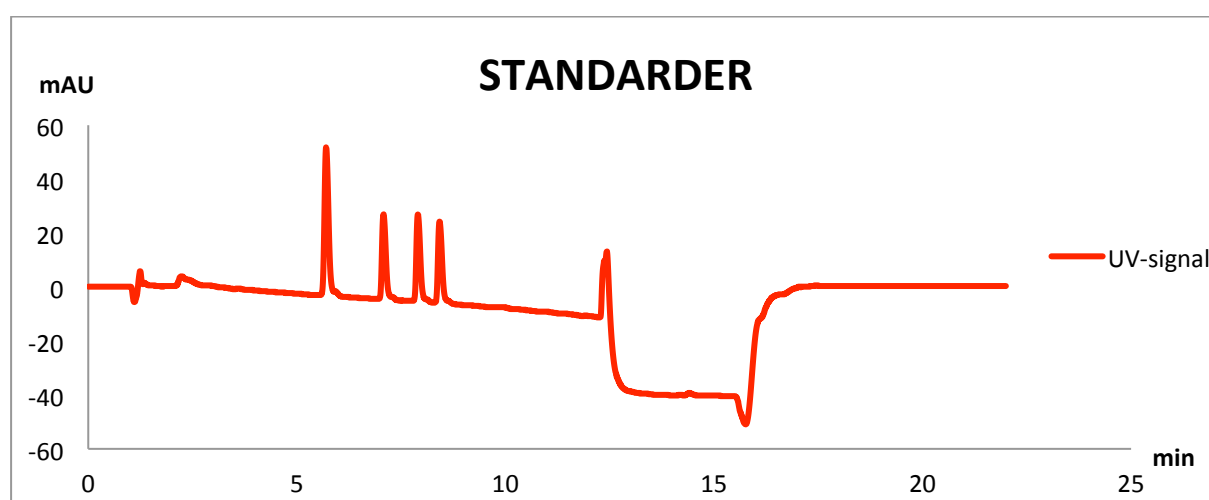
Enkelte målinger i forsøkene hadde et betydelig avvik fra resten av målingene. Siden man ikke viste om at disse avvikene var på grunn av feil i det eksperimentelle arbeidet, ble det brukt Q-tester for å se om disse målingene kunne forkastes eller ei. Framgangsmåten for Q-test er beskrevet i boka til Pedersen-Bjergaard og Rasmussen side 60-61 [25].

## 6 RESULTATER OG DISKUSJON

PALME er en relativ ny prøveopparbeidelsesmetode og ble første gang publisert i 2013 [9]. Det har ikke blitt gjort grundig undersøkelse av ekstraktenes renhet tidligere. Det er viktig med rene ekstrakter da uønskede komponenter i ekstraktene kan både påvirke analyseresultatene og ødelegge analyseapparatet. Av den grunn har målet med denne oppgaven vært å undersøke ekstraktenes renhet fra plasma på en grundig måte. I tillegg til undersøkelse av ekstraktenes renhet ble det fokusert på optimalisering av ulike betingelser og parametere i PALME for å få best mulig ekstraksjonsutbytter av modellanalyttene fra plasma.

### 6.1 Ekstraksjonsutbytter

Et av målene med denne oppgaven var å undersøke hvor store ekstraksjonsutbytter man får med PALME. Både ”hjemmelagede” (polypropylenmembran) og den kommersielt tilgjengelige akseptorplaten (PVDF-membran) ble testet. Legemiddelfritt plasma og 40 mM NaOH ble spiket med modellanalyttene amitriptylin, quetiapin, fluoxetin og haloperidol, og ble fortynnet med henholdsvis 40 mM NaOH og rensset vann. Væskemembraner basert på diheksyleter, dodecylacetat og isopentylbenzen ble testet. Ekstraksjonstiden var 30 minutter. Detaljert prosedyre for ekstraksjonen er oppgitt i seksjon 5.5.1.



Figur 6.1: LC-UV kromatogram over resultater fra analyse på standardløsning av modellanalyttene quetiapin, haloperidol, amitriptylin og fluoxetin.

Analyttkonsentrasjon: 5 µg/ml

Figur 6. 1 viser et LC-UV kromatogram over resultater fra analyse på standardløsning av modellanalyttene quetiapin, haloperidol, amitriptylin og fluoxetin med retensjonstider henholdsvis 5,70 min, 7,08 min, 7,90 min og 8,42 min. Figuren viser at man får fine topper for modellanalyttene. Figuren viser videre at modellanalyttene er godt separert fra hverandre. Ingen andre uønskede komponenter ble detektert. Dette viser at vår HPLC – UV metode fungerte tilfredsstillende. Tabell 6.1-6.4 viser resultatene fra ulike prøvematrikser og akseptorplater.

**Tabell 6.1:** Ekstraksjonsutbytter av modellanalyttene. Tabellen viser ekstraksjonsutbytter i % for modellanalyttene. Tallene i parentesene representerer RSD verdiene i %.

Modellanalytt	Type væskemembran		
	Isopentylbenzen	Diheksyleter	Dodecylacetat
Quetiapin	72,8 (10,2)	50,1 (11,9)	66,7 (2,4)
Haloperidol	83,1 (9,1)	82,1 (6,1)	90,5 (3,9)
Amitriptylin	65,1 (10,4)	75,9 (5,8)	79,8 (8,9)
Fluoxetin	68,6 (7,8)	74,5 (7,7)	79,3 (5,3)

*Prøvevolum: 250 µl (plasma); Væskemembran: isopentylbenzen-, diheksyleter-, og dodecylacetat-basert; akseptorplate: PP-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; analyttkonsentrasjon: 1 µg/ml; NaOH-konsentrasjon: 20mM;*

**Tabell 6.2:** Ekstraksjonsutbytter av modellanalyttene. Tabellen viser ekstraksjonsutbytter i % for modellanalyttene. Tallene i parentesene representerer RSD verdiene i %.

Modellanalytt	Type væskemembran		
	Isopentylbenzen	Diheksyleter	Dodecylacetat
Quetiapin	55,5 (7,9)	35,5 (4,5)	54,9 (8,2)
Haloperidol	44,0 (6,8)	47,5 (4,8)	75,6 (5,7)
Amitriptylin	38,0 (9,9)	50,1 (9,2)	66,4 (5,2)
Fluoxetin	45,3 (7,4)	42,2 (5,2)	54,2 (5,7)

*Prøvevolum: 250 µl (plasma); Væskemembran: isopentylbenzen-, diheksyleter-, og dodecylacetat-basert; akseptorplate: PVDF-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; analyttkonsentrasjon: 1 µg/ml; NaOH-konsentrasjon: 20mM;*

**Tabell 6.3:** Ekstraksjonsutbytter av modellanalyttene. Tabellen viser ekstraksjonsutbytter i % for modellanalyttene. Tallene i parentesene representerer RSD verdiene i %.

Modellanalytt	Type væskemembran		
	Isopentylbenzen	Diheksyleter	Dodecylacetat
Quetiapin	106,8 (12,2)	88,6 (3,3)	101,3 (4,5)
Haloperidol	92,4 (13,6)	90,0 (3,6)	88,6 (10,0)
Amitriptylin	67,4 (11,9)	62,9 (6,5)	52,0 (23,6)
Fluoxetin	77,4 (11,2)	72,8 (4,8)	63,8 (21,2)

Prøvevolum: 250  $\mu$ l (vann); Væskemembran: isopentylbenzen-, diheksyleter-, og dodecylacetat-basert; akseptorplate: PP-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; analyttkonsentrasjon: 1  $\mu$ g/ml; NaOH-konsentrasjon: 20mM;

**Tabell 6.4:** Ekstraksjonsutbytter av modellanalyttene. Tabellen viser ekstraksjonsutbytter i % for modellanalyttene. Tallene i parentesene representerer RSD verdiene i %.

Modellanalytt	Type væskemembran		
	Isopentylbenzen	Diheksyleter	Dodecylacetat
Quetiapin	91,3 (9,3)	83,2 (3,7)	89,5 (9,7)
Haloperidol	77,4 (7,7)	68,2 (4,5)	64,1 (8,4)
Amitriptylin	54,4 (14,1)	44,8 (14,1)	33,6 (7,6)
Fluoxetin	63,8 (9,8)	49,6 (7,6)	32,7 (9,5)

Prøvevolum: 250  $\mu$ l (vann); Væskemembran: isopentylbenzen-, diheksyleter-, og dodecylacetat-basert; akseptorplate: PVDF-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; analyttkonsentrasjon: 1  $\mu$ g/ml; NaOH-konsentrasjon: 20mM;

I tabell 6.1 og 6.2 er det oppsummert ekstraksjonsutbytter fra plasma som prøvematriks. Mens tabell 6.1 representerer resultater fra polypropylen-baserte akseptorplater, representerer tabell 6.2 resultater fra PVDF-baserte akseptorplater. Resultatene viser at man får lavere utbytte med PVDF-baserte akseptorplater. Dette er ikke overaskende da PVDF kan ha uspesifikk binding av legemidler [9]. Når man studerer tabellene nøye ser man at ekstraksjonsutbytter er avhengige av hvilken type væskemembran man benytter. Væskemembraner med diheksyleter ga lavere ekstraksjonsutbytter enn væskemembraner med isopentylbenzen og dodecylacetat. Samme væskemembran ga ulike ekstraksjonsutbytter for hver modellanalytt. Når alle resultatene oppsummeres, ser man at det er tre faktorer som påvirket ekstraksjonsutbyttene, nemlig type væskemembran, type akseptorplate og egenskapene til analyttene. Væskemembraner med dodecylacetat ga høyere utbytter for stoffer med høy logP-verdi. For eksempel for amitriptylin som har høyest logP-verdi blant modellanalyttene, ble utbyttet

høyest med dodecylacetat. Igjen viser resultatene at for stoffer med mer polare egenskaper ga væskemembraner med isopentylbenzen høyest utbytte. Dette ser man med quetiapin som har lavest logP-verdi.

RSD-verdiene for begge akseptorplatene og for alle væskemembranene og modellanalyttene var tilfredsstillende. Disse RSD-verdiene lå mellom 2,4 og 11,9 %. Når det tas en helhetlig vurdering av RSD-verdiene ser man at det er mindre variasjon med PVDF-baserte væskemembraner. Dette kan skyldes at de polypropylen-baserte akseptorplatene var ”hjemmelagede” og tykkelsen av membranfilteret kunne variere fra brønn til brønn, og en liten hull eller lekkasje kunne påvirke analyseresultatene betydelig.

I tabell 6.3 og 6.4 er det oppsummert ekstraksjonsutbytter fra vann som prøvematriks. Mens tabell 6.3 representerer resultater fra polypropylen-baserte akseptorplater, representerer tabell 6.4 resultater fra PVDF-baserte akseptorplater. Her vises det også at PVDF-baserte akseptorplater ga lavere ekstraksjonsutbytter og RSD-verdier. Resultatene i tillegg viser også at ekstraksjonsutbytter var avhengige av type væskemembran, type akseptorplater, egenskapene til de stoffene man er interessert i, og av type prøvematriks. Som det ble nevnt i forrige avsnitt, væskemembraner med dodecylacetat ga høyest utbytte for modellanalytten amitriptylin i plasma. Når prøvematriksen ble endret ser man at væskemembraner med dodecylacetat ga lavest utbytte for amitriptylin, uavhengig av type akseptorplate. Det anbefales å gjennomføre samme studie med nye upolare stoffer.

## **6.2 Undersøkelse av ekstraktenes renhet**

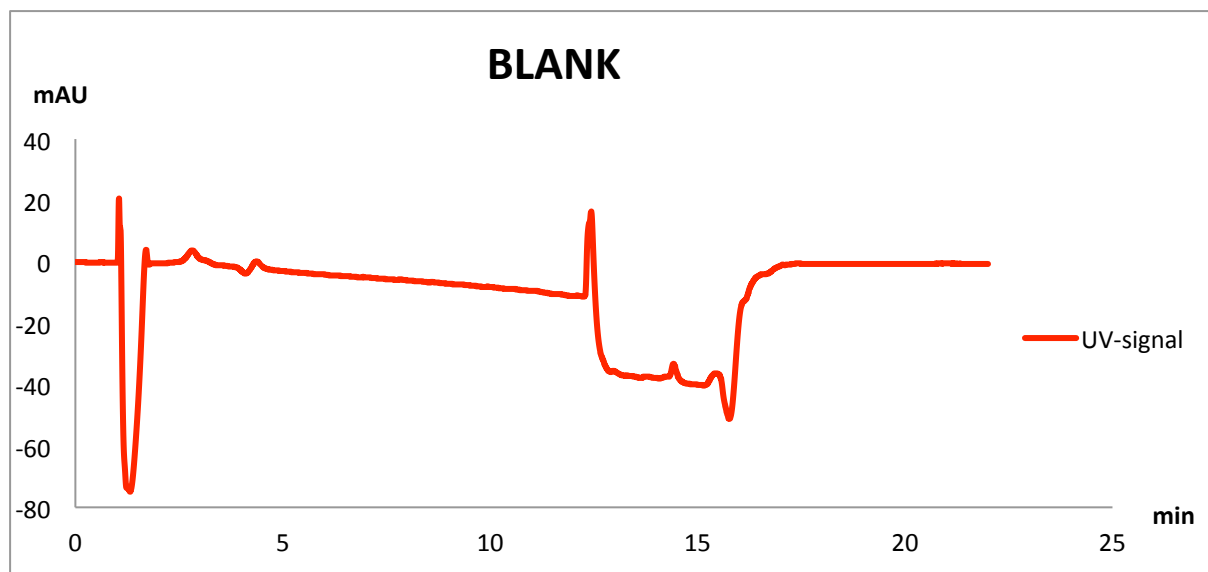
I dette arbeidet ble det gjort en god del forsøk for å vise at ekstraktene fra plasma var frie for endogene og eksogene komponenter utenom analyttene av interesse. Disse forsøkene innebærer monitorering av UV-absorberende komponenter ved CE, indirekte deteksjon av kationer og anioner ved CE, måling av ekstraktenes ledningsevne, kvantitativ og kvalitativ måling av matrikseffekter i LC-MS, monitorering av fosfolipider ved LC-MS og monitorering av UV-absorberende komponenter i HPLC.

### **6.2.1 Monitorering av UV-absorberende komponenter med HPLC**

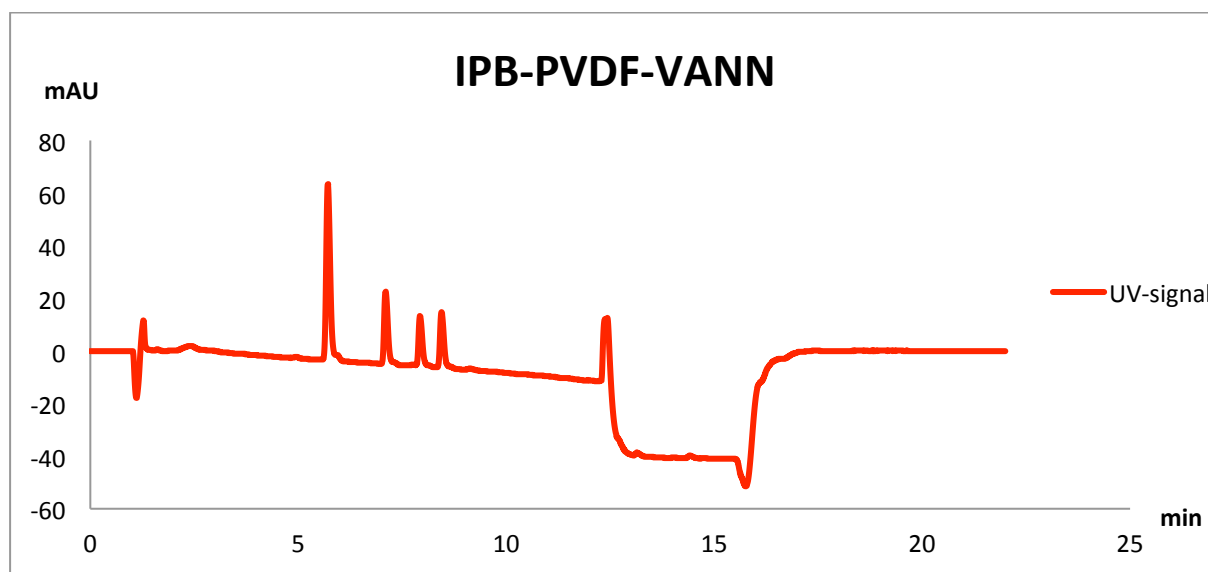
I tillegg til beregning av ekstraksjonsutbytter, ble det samtidig undersøkt for UV-absorberende komponenter i PALME-ekstrakter med HPLC. Figur 6.2 – 6.6 viser

kromatogrammer for ekstrakter fra ulike prøvematrikser og ulike akseptorplater. I tillegg vises det et kromatogram fra en blank akseptorfase.

Figurene viser videre at man får fine topper for analyttene. Når man sammenligner kromatogrammer fra vann og plasma som prøvematrikser, ser man at de er nesten identiske. Dette viser at PALME-ekstrakter fra hverken PVDF-baserte akseptorplater eller polypropylen-baserte akseptorplater inneholdt UV-absorberende komponenter.

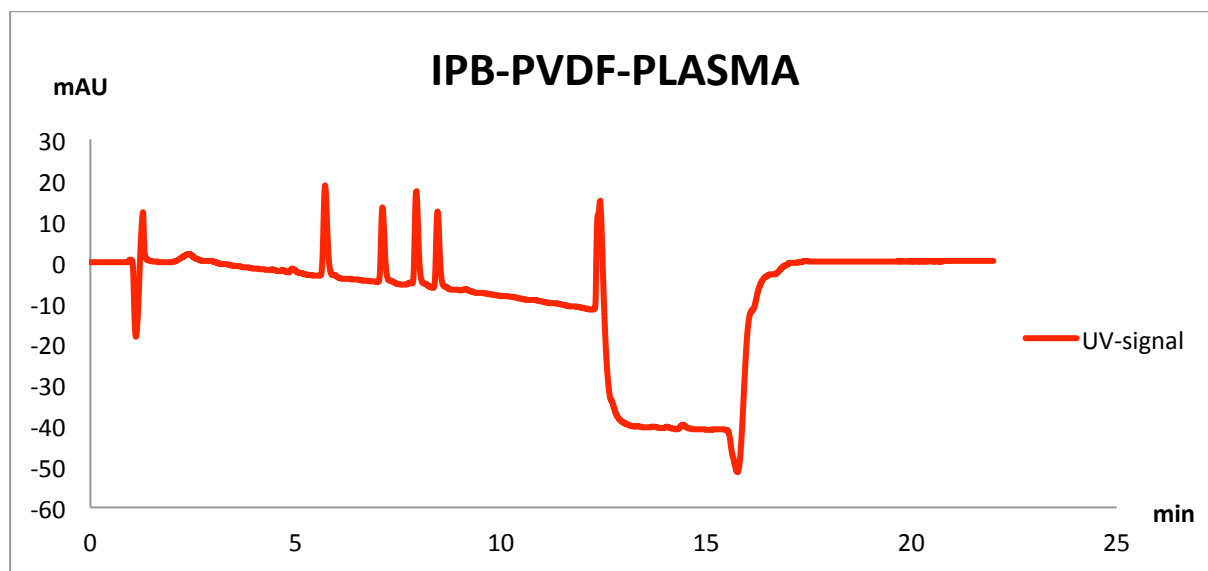


**Figur 6.2:** LC-UV kromatogram over resultater fra analyse på blank akseptorfase. Det vises bare bakgrunnssignal og dermed er det ingen UV-absorberende komponenter i blank prøve.



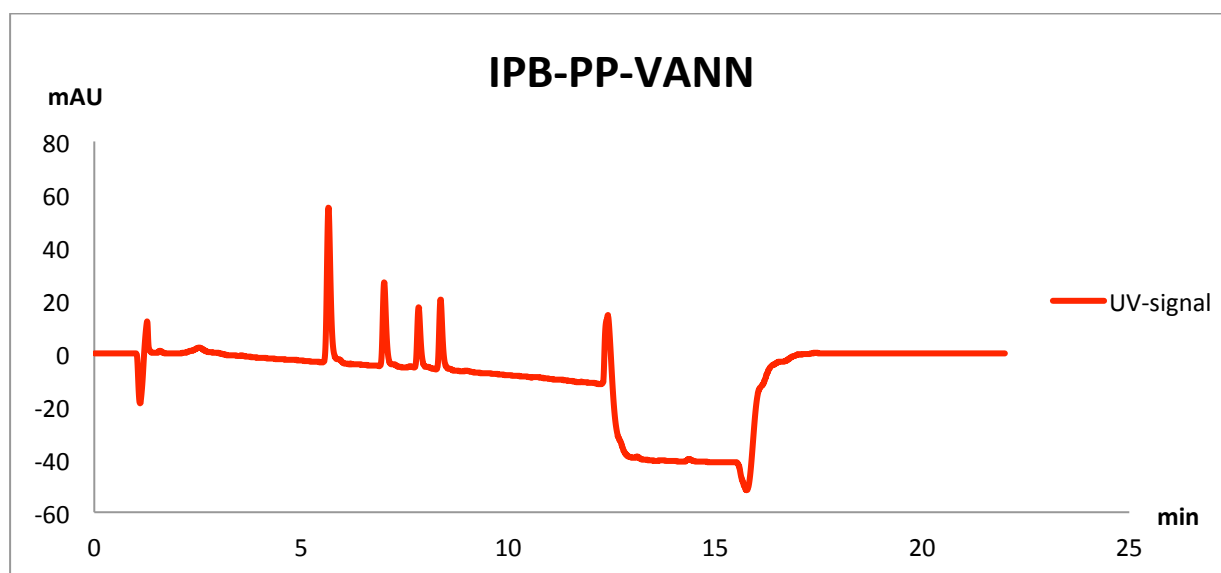
**Figur 6.3:** LC-UV kromatogram over resultater fra analyse på ekstrakter fra spiket vann.  
*Prøvevolum: 250  $\mu$ l (vann); væskemembran: isopentylbenzen-basert; akseptorplate: PVDF-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; analyttkonsentrasjon: 1  $\mu$ g/ml; NaOH-konsentrasjon: 20mM;*





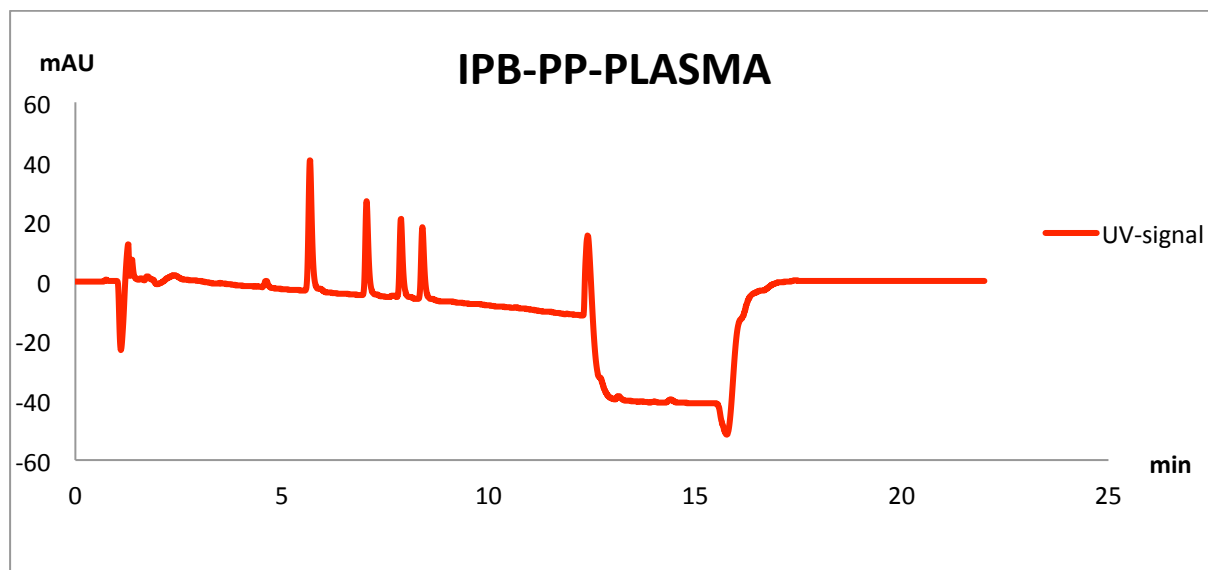
**Figur 6.4: LC-UV kromatogram over resultater fra analyse på ekstrakter fra spiket plasma.**

*Prøvevolum: 250  $\mu$ l (plasma); væskemembran: isopentylbenzen-basert; akseptorplate: PVDF-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; analyttkonsentrasjon: 1  $\mu$ g/ml; NaOH-konsentrasjon: 20mM*



**Figur 6.5: LC-UV kromatogram over resultater fra analyse på ekstrakter fra spiket vann.**

*Prøvevolum: 250  $\mu$ l (vann); væskemembran: isopentylbenzen-basert; akseptorplate: PP-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; analyttkonsentrasjon: 1  $\mu$ g/ml; NaOH-konsentrasjon: 20mM;*



**Figur 6.6: LC-UV kromatogram over resultater fra analyse på ekstrakter fra spiket plasma.**

*Prøvevolum: 250 µl (vann); væskemembran: isopentylbenzen-basert; akseptorplate: PP-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; analyttkonsentrasjon 1 µg/ml; NaOH-konsentrasjon 20mM;*

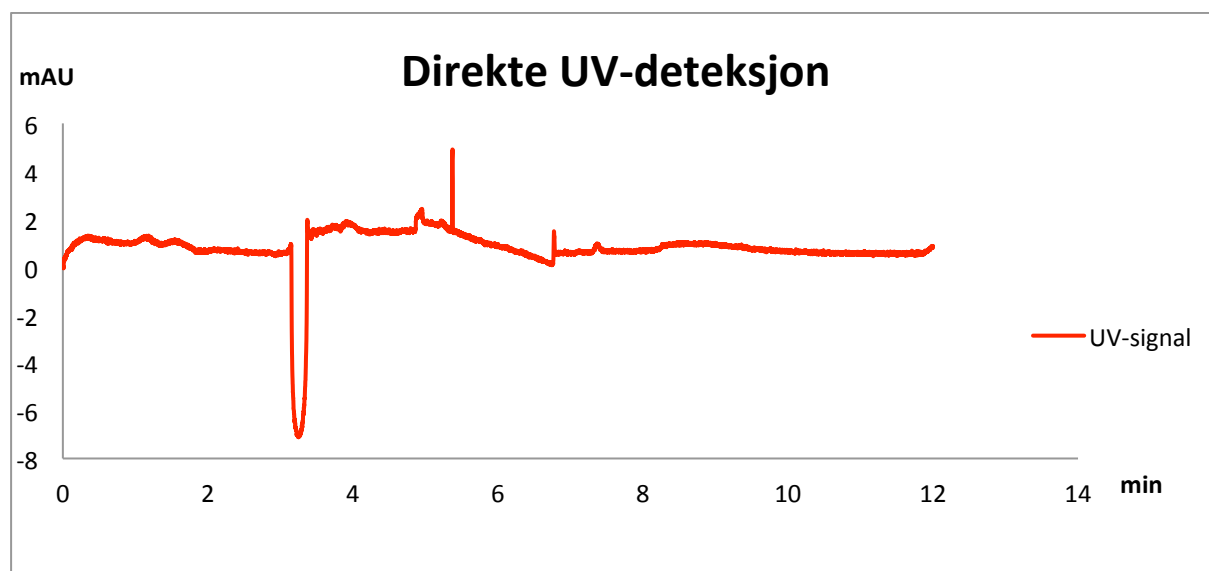
## 6.2.2 Monitorering av ioner og UV-absorberende komponenter med CE

For å kunne påvise at ekstraktene fra plasma var frie for endogene ioner ble det gjort direkte UV-deteksjon av komponenter som har en UV-absorbans i CE, og indirekte UV-deteksjon av natrium ( $\text{Na}^+$ ) og klor ( $\text{Cl}^-$ ) ioner. I tillegg ble det utført et forsøk hvor det ble evaluert ekstraktens ledningsevne.

Det er ioner i en løsning som leder strøm. Måling av ledningsevne kan gi en god pekepinn på hvorvidt ekstraktene inneholder ioner. En økning i ledningsevnen kan tyde på at ionene fra plasma er diffundert gjennom væskemembranen over i akseptorfasen. I dette forsøket ble blank plasma som var fortynnet med 40 mM NaOH ekstrahert gjennom en diheksyleter basert kunstig væskemembran. Akseptorplaten som ble benyttet i eksperimentet var basert på polypropylenmembraner. For å kunne se ioner fra plasma ble PALME-ekstraktet sammenlignet med 20 mM ren maursyre. Det ble pålagt en spenning på 10 kV både på ren maursyre og ekstraktet (se seksjon 5.8.2). Deretter ble strømstyrken registrert. Da det ble pålagt 10 kV spenning på ren maursyre ble det registrert en strømstyrke på 7,5 µA. Deretter ble samme spenning lagt på PALME-ekstraktet og den registrerte strømstyrken var på 5 µA. Resultatene viste at det var en reduksjon i strømstyrken. I teorien ville man forvente at resultatene fra begge målingene skulle være like dersom det ikke ble overført ioner til akseptorfasen ved PALME. Den mest logiske forklaringen for reduksjonen i ledningsevnen er

at det er en reduksjon i maursyre-konsentrasjonen i ekstraktet. En reduksjon på 2,5  $\mu\text{A}$  i strømstyrken tyder på at konsentrasjonen av maursyre i ekstraktet ble redusert med omtrent 1/3. Maursyre er flyktig og litt løselig i diheksyleter, noe som kan tyde på at en del maursyre diffunderte inn i væskemembranen, og at en del av maursyren fordampet.

Det ble undersøkt hvorvidt blankt plasma-ekstrakt inneholder UV-absorberende komponenter som kan detekteres med CE. Plasma fortynnet med 40 mM NaOH ble ekstrahert gjennom diheksyleter som kunstig væskemembran. Akseptorplatene i dette forsøket var basert på polypropylenmembraner. Ekstraktet ble undersøkt for basiske, sure og nøytrale UV-absorberende komponenter ved hjelp av CE. Figur 6.7 viser et elektroferogram fra PALME-ekstraktet. Separasjonsbufferen i dette forsøket var basisk borat buffer.



**Figur 6.7: CE-UV analyse av PALME-ekstraktet.**

*Prøvevolum: 250  $\mu\text{l}$  (plasma); væskemembran: diheksyleter-basert; akseptorplate: PP-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; NaOH-konsentrasjon 10mM;*

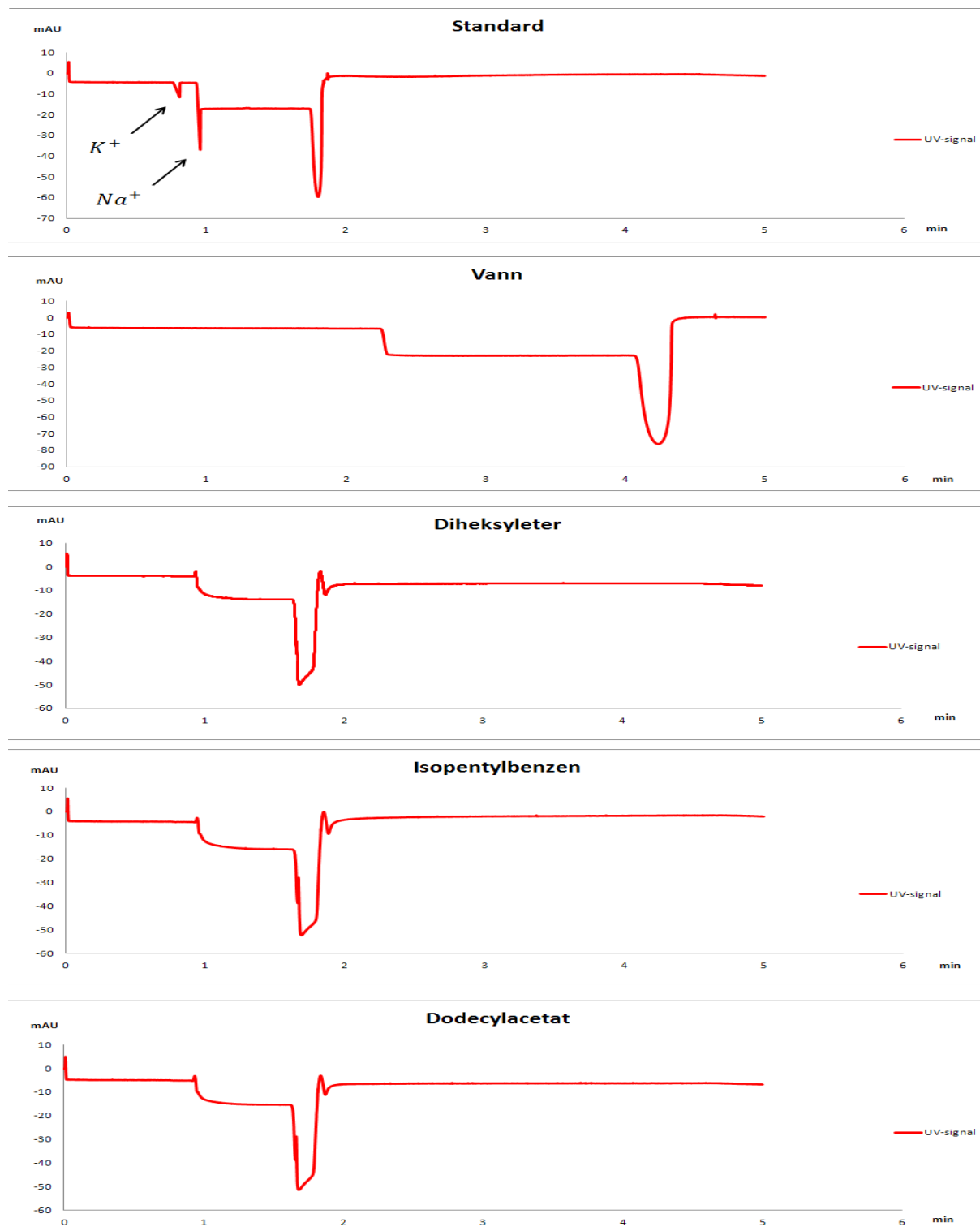
Blankt ekstrakt med diheksyleter som væskemembran ble undersøkt for basiske, sure og nøytrale komponenter. Som det vises i elektroferogramet ble det ikke observert signifikant signal mellom 0 min og 3,1 min. Dette viser at det var ingen positiv ladede UV-absorberende komponenter i PALME-ekstraktet. Fra tiden ca. 3,1 min til ca. 3,4 min var det en reduksjon i signalet. Denne reduksjonen i signalet viser elektroosmotisk flow (EOF) og at det er derfor sannsynligvis ikke noe UV-absorberende nøytrale komponenter i PALME-ekstraktet. Etter 3,4 min ble det igjen ikke observert noe signifikant signal. I dette tidsintervallet ble det målt om det var noen negativ ladede UV-absorberende komponenter i PALME-ekstraktet. Siden

det stort sett kun ble målt bakgrunnssignal, kan det konkluderes med at det var ingen negativ ladede UV-absorberende komponenter i ekstraktet.

Natrium- ( $\text{Na}^+$ ) og klorid ( $\text{Cl}^-$ )-ioner er de mest vanlige små ionene som man finner i plasma. Både  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  ioner mangler UV-absorbans. Derfor ble det benyttet CE med indirekte UV-deteksjon for å undersøke tilstedeværelsen av  $\text{Na}^+$  -og  $\text{Cl}^-$  -ioner i ekstraktene. Dette ble gjort for å bekrefte resultatene fra ledningsevne målingene. I denne studien ble det brukt tre forskjellige kunstige væskemembraner. Disse væskemembranene var basert på diheksyleter, isopentylbenzen og dodecylacetat. Akseptorplatene var fortsatt basert på polypropylenmembraner. Blank plasma fortynnet med 40 mM NaOH ble ekstrahert. Akseptorløsningen var 50  $\mu\text{l}$  20 mM maursyre. Metodene som ble brukt til CE med indirekte UV-deteksjon av  $\text{Na}^+$  - og  $\text{Cl}^-$  -ioner var basert på tidligere forsøk som ble utført av Altria og hans medarbeidere [39, 40]. Prinsipper og betingelser for CE med indirekte UV-deteksjon er beskrevet i seksjon 4.5.1 og 5.6.3.

For CE med indirekte UV-deteksjon av  $\text{Na}^+$  ioner ble det brukt imidazol og maursyre for å lage en bufferløsning. Imidazol- og maursyre-løsningen gir et høyt og konstant bakgrunns UV-signal [39]. Når  $\text{Na}^+$  - eller kalium- ( $\text{K}^+$ ) ioner passerer UV-detektoren vil de forårsake en reduksjon av signalet. Standardløsninger av KCl og NaCl ble brukt til kalibrering. Elektroferogramene fra ekstraktene ble sammenlignet med elektroferogramene fra deionisert vann og standardløsning. I Figur 6.8 vises det fem elektroferogramer, henholdsvis for standardløsningen, deionisert vann og PALME-ekstraktene med ulike væskemembraner.

Det øverste elektroferogramet viser resultater fra standardløsningen som består av kaliumklorid (KCl) og natriumklorid (NaCl). Rekkefølgen til  $\text{K}^+$  - og  $\text{Na}^+$  -ionene er ikke som man ville forvente. Kalium er tyngre enn natrium og derfor vil den i teorien ha lengre migrasjonstid i CE. Den uvanlige rekkefølgen til migrasjonstidene skyldes at  $\text{K}^+$  -ionene migrerer raskere langs kapillæret enn imidazol som ble brukt for å ha et bakgrunnssignal [39]. Det neste elektroferogramet er fra deionisert vann som er fri for  $\text{K}^+$  - og  $\text{Na}^+$  -ionene. Som forventet er det ingen topper i dette elektroferogrammet. De siste tre elektroferogrammene er fra blanke PALME-ekstrakter som ble ekstrahert gjennom henholdsvis diheksyleter, isopentylbenzen og dodecylacetat som SLM. Elektroferogrammene for alle disse tre ekstraktene viser ingen signal for hverken  $\text{K}^+$  - eller  $\text{Na}^+$  -ioner. Ekstraktene så ut til å være frie for disse ionene, og PALME med diheksyleter, isopentylbenzen og dodecylacetat baserte kunstige væskemembraner ga  $\text{K}^+$  og  $\text{Na}^+$  frie ekstrakter.



**Figur 6.8: Resultater fra indirekte UV-deteksjon av  $Na^+$  med CE. Det øverste elektroferogrammet viser resultater fra standardløsningen som ble brukt for å kalibrere instrumentet. Det neste elektroferogrammet viser resultater fra deionisert vann som ble brukt for å vise at CE-metoden fungerer tilfredsstillende. De siste tre elektroferogrammene tilhører PALME-ekstrakter med henholdsvis diheksyleter, isopentylbenzen og dodecylacetat som SLM.**

*Prøvevolum: 250  $\mu$ l (plasma); akseptorplate: PP-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; NaOH-konsentrasjon 20mM;*

For indirekte UV-deteksjon av  $\text{Cl}^-$ -ioner ble det brukt en blanding av en kationisk surfaktant (tetradecyltrimetylammoniumbromid (TTAB)) og kromat for å lage en buffer. TTAB ble brukt for å reversere retningen til den elektroosmotisk-”flow”en og dermed vil en negativ pålagt spenning føre til migrering av anioner gjennom detektoren. Kromat ble brukt for å danne et bakgrunns UV-signal [40].

Ekstraktene som ble brukt til indirekte UV-deteksjon av  $\text{K}^+$ - eller  $\text{Na}^+$ -ionene ble også testet for  $\text{Cl}^-$ . I tillegg ble det gjort målinger på ren maursyre og natriumformat. Det var vanskelig å tolke resultatene fra disse prøvene på grunn av store variasjoner i migrasjonstidene til  $\text{Cl}^-$ . Derfor var det vanskelig å konkludere med at ekstraktene var frie for kloridionene eller ekstraktene inneholdt kloridionene.

### **6.2.3 Monitorering av fosfolipider med LC-MS**

Fosfolipider som er sammensatt av ester eller amid derivater av glyserol eller sfingosin med fettsyrer eller fosforsyrer, er involvert i mange biologiske transportprosesser. Denne stoffgruppen er en av de viktigste bestanddelene i cellemembraner og fosfolipider forekommer i betydelige mengder i blodprøver. I moderne farmasøytiske laboratorier er LC-MS den mest brukte analysemetoden til kvantitativ analyse av legemidler i biologiske prøver. Tilstedeværelsen av fosfolipidene i ekstrakter av biologiske prøver er uønskelig i kombinasjon med LC-MS, da de ved ko-eluering kan påvirke ioniseringen av de analyttene man er interessert i (matrikseffekt i LC-MS). En slik påvirkning kan ha stor betydning for analysemetodens sensitivitet, reproducerbarhet og nøyaktighet.

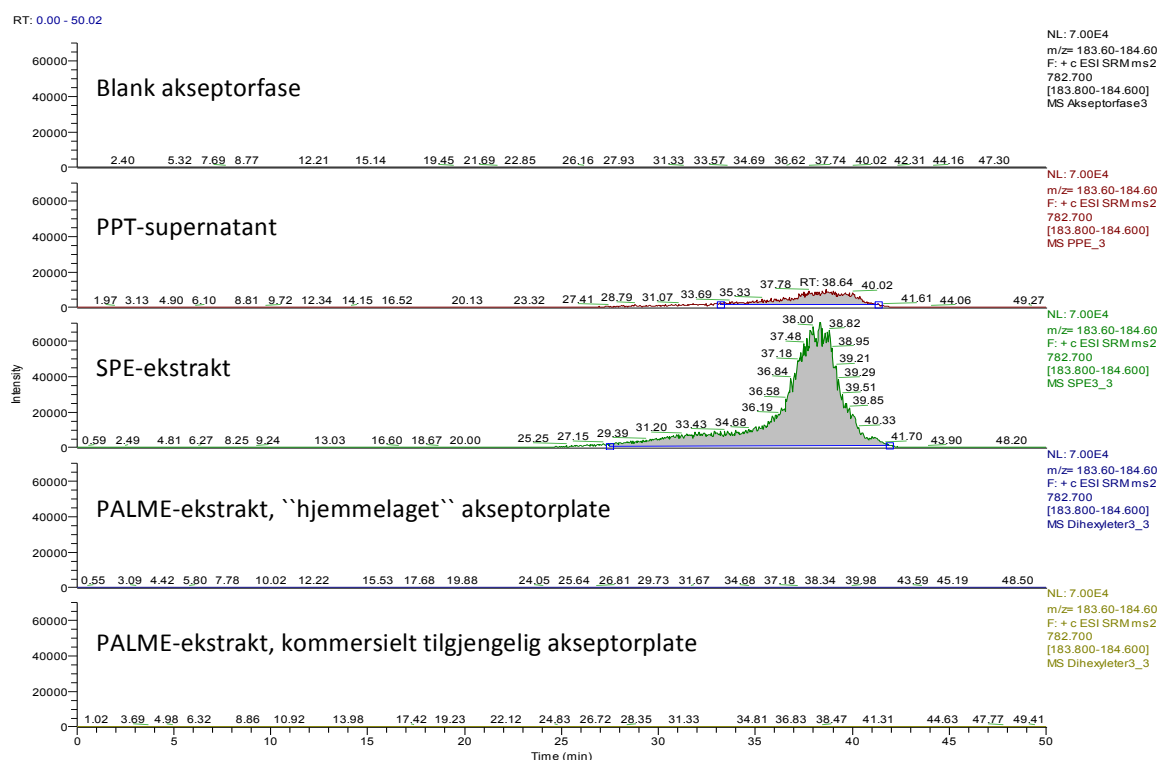
Det har blitt studert ulike strategier for å minimalisere matrikseffekter i LC-MS. Bruk av isotopmerkede internstandarder av de analyttene man er interessert i, injeksjon av små volumer av prøveløsningen, fortynning av prøveløsningen, optimaliseringen av kromatografiske parametere i LC-MS og bruk av alternative ioniseringsteknikker er eksempler på disse strategier [47-50]. Bruk av isotopmerkede internstandarder vil ofte kompensere matrikseffekter i LC-MS [51, 52]. I tillegg er isotopmerkede internstandarder ikke alltid kommersielt tilgjengelige eller de som er kommersielt tilgjengelige kan være dyre [15, 53]. Injeksjon av små prøvevolumer, fortynning av prøveløsning eller optimalisering av kromatografiske parametere i LC-MS kan være en god tilnærming så lenge analysemetodens sensitivitet ikke påvirkes [54]. Det har blitt vist at APCI er mindre følsom for matrikseffekter enn ESI, så bruk av APCI istedenfor ESI kan også være en god tilnærming [35]. Siden ESI er

godt egnet for polare stoffer og APCI er godt egnet for upolare eller mindre polare stoffer, bør kjemiske egenskapene til de analyttene som man er interessert i vurderes nøye før man benytter APCI istedenfor ESI [28].

Den mest relevante metoden for å unngå matrikseffekter som skyldes tilstedeværelse av endogene komponenter i prøveløsningen i LC-MS er optimalisering av prøveopparbeidelsesmetoden. Proteinfelling som en prøveopparbeidelsesmetode fjerner kun proteiner fra plasma, mens fosfolipider stort sett vil bli i supernatanten. Supernatanter fra proteinfellingsmetoden vil derfor inneholde betydelige mengder av fosfolipider. Sammenlignet med proteinfelling vil fast-faseekstraksjon gi renere ekstrakter, og derfor vil graden av matrikseffekter i SPE-ekstrakter bli lavere enn i PPT-supernatanter [10, 55]. Dams og hans medarbeidere har sammenlignet supernatanter fra proteinfelling med ekstrakter fra SPE og de påviste at SPE gir renere ekstrakter, men oppkonsentreringen av de endogene komponentene i ekstraktene sammen med analyttene var den største utfordringen [56]. Væske-væske ekstraksjon med flere trinn gir svært rene ekstrakter, men for å få best mulig ekstraksjonsutbytte av analyttene vil det ofte være behov for flere ekstraksjonstrinn og derfor vil væske-væske ekstraksjon bli en tungvidt prøveopparbeidelsesmetode for å få rene ekstrakter med høye ekstraksjonsutbytte [50, 57]. Det største fokuset i dette arbeidet har dermed vært å påvise at PALME som en ny prøveopparbeidelsesmetode gir rene ekstrakter uten påviselige mengder fosfolipid. Ekstrakter fra SPE og PPT ble sammenlignet med PALME-ekstrakter ved LC-MS. Ekstraksjonsprosedyrene for de ulike prøveopparbeidelsesmetodene er beskrevet i seksjon 5.5.1. I denne studien ble det brukt tre forskjellige kunstige væskemembraner i PALME som var henholdsvis diheksyleter, isopentylbenzen og dodecylacetat. PALME-ekstraktene ble sammenlignet med PPT-supernatanten for å kontrollere at vår LC-MS metode fungerte tilfredsstillende. Som nevnt tidligere fjerner PPT kun proteiner fra plasma og dermed vil man få høye konsentrasjoner av fosfolipider i PPT-prøvene. Som det også ble nevnt gir SPE renere ekstrakter enn PPT og siden det er første gangen man studerer fosfolipider i PALME-ekstrakter, ble disse ekstraktene sammenlignet med SPE for å vise at PALME gir minst like rene eller renere ekstrakter enn SPE.

I første forsøksserie ble ekstrakter fra PALME, PPT og SPE samt akseptorløsningen som var 20 mM maursyre undersøkt for fosfolipider ved LC-MS/MS i SRM-mode. I første omgang ble det studert PALME-ekstrakter fra akseptorplater med polypropylenmembraner. De ulike

masseovergangene for de undersøkte fosfolipidene er oppsummert i tabell 5.12. Disse valgte masseovergangene ble hentet fra tidligere studier [18, 58-60] og dekker de mest vanlige fosfolipidene som man finner i humant plasma. Disse fosfolipidene inkluderer lysofosfatidylkolin (Lyso-PC), fosfatidylkolin (PC), sfingomyelin (SM), lysofosfatidyletanolamin (Lyso-PE), fosfatidyletanolamin (PE), lysofosfatidyl-glycerol (Lyso-PG) og lysofosfatidylserin (Lyso-PS).



**Figur 6.9: LC-MS/MS kromatogrammer over resultater fra analyser på masseovergangen 782.7→184.2 i ulike prøver.**

**PALME:** Prøvevolum: 250  $\mu$ l (plasma); væskemembran: diheksyleter-basert; akseptorplate: PVDF- og PP-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; NaOH-konsentrasjon 20mM;

**SPE:** Prøvevolum: 1000  $\mu$ l (plasma + rensset vann); SPE-kolonne: Oasis MCX; reløsningsmiddel; 200  $\mu$ l mobilfase A

**PPE:** Prøve: legemiddelfritt plasma; fellingsreagens: acetonitril; sentrifugering: ved 10000 rpm i 10 minutter

Figur 6.9 viser kromatogrammer for masseovergangen 782.7→184.2. Det øverste kromatogrammet viser resultatet for masseovergangen 782.7→184.2 i akseptorfase, og man ser at det er ingen klare toppler for denne masseovergangen i kromatogrammet. Kromatogrammene fra PALME-ekstraktene med ulike væskemembraner viser lignende resultater, altså ingen tydelige toppler for denne masseovergangen. Når man ser på det andre og det tredje kromatogrammet som representerer resultater fra henholdsvis SPE-ekstrakt og



PPT-supernatant, ser man en stor topp for masseovergangen 782.7→184.2. Sammenlignet med PPT-supernatanten er topphøyden og topparealet større i SPE-ekstraktet. Dette er ikke som forventet. Dette kan enten skyldes feil i den eksperimentelle delen av SPE, eller at en del av fosfolipidene er utfellet med proteiner under PPT. Resultatene fra dette avsnittet viser at PALME teknikken gir renere ekstrakter enn PPT og SPE.

Tabell 6.5-6.7 oppsummerer resultatene fra de undersøkte ekstraktene. I tabell 6.7 vises det at det ble detektert signaler for de fleste av undersøkte masseovergangene i PPT-supernatanten. Dette bekrefter at humant plasma inneholder alle de ovennevnte fosfolipidene og at vår LC-MS metode klarte å monitorere de undersøkte fosfolipidene. Det ble ikke detektert signaler fra masseovergangene 513,2→341,2 og 768,6→627,5 som er henholdsvis spesifikke masseoverganger for LysoPG og PE. De masseovergangene som ga signaler for PPT-supernatanten ga også signaler for SPE-ekstrakter noe som tyder på at man ikke klarer å fjerne fosfolipider med SPE heller. Topparealet og topphøyden for de detekterte masseovergangene i SPE-ekstraktet og PPT-supernatanten var omtrent like store. For å være sikker på at resultatene ikke skyldes tilfeldigheter ble tre paralleller av SPE-ekstrakter analysert.

I tabell 6.5 er det oppsummert resultater fra PALME-ekstrakter med ulike væskemembraner. Akseptorplatene var basert på polypropylenmembraner. Først ble det analysert akseptorfase for å sjekke at den ikke inneholdt fosfolipider. Det ble detektert signaler fra masseovergangene 496.1→184.1 og 758.5→184.1 i blank akseptorfase. Lab-utstyrene ble vasket godt før akseptorløsningen ble laget, og det har blitt brukt maursyre fra en ny åpnet flaske. Signalene fra disse masseovergangene kan skyldes enten en forurensning i LC-MS systemet eller andre stoffer i løsningen som man ikke vet hva de er, og som har disse masseovergangene. Det ble derfor sett bort fra disse to masseovergangene ved vurdering av ekstraktenes renhet. Ellers ble det ikke detektert noen signaler for de øvrige masseovergangene.

Det ble analysert tre paralleller av PALME-ekstrakter fra hver enkel væskemembran. Som det vises i tabell 6.5 ble det ikke registrert signaler for de undersøkte masseovergangene når PALME ble utført med diheksyleter og dodecylacetat som SLM. Dette viser at diheksyleter og dodecylacetat som SLM var en effektiv barriere mot fosfolipider og at PALME kan være svært effektiv i fjerning av fosfolipider fra humant plasma.

Resultatene fra isopentylbenzen basert væskemembran var overaskende. Alle parallellene ga signal for de meste fosfolipidene. Dette kan ha to forklaringer. Den ene forklaringen kan være at det har skjedd en lekkasje. I og med at disse akseptorplatene var ”hjemmelagede” og ikke er testet for lekkasje kan denne forklaringen være logisk. Den andre forklaringen kan være at isopentylbenzen løser opp membranen og på denne måten punkterer akseptorplaten. For å kunne trekke en sikker konklusjon ble det analysert ekstrakter fra PVDF-baserte kommersielt tilgjengelige akseptorplater. Alle de tre væskemembranene ble testet. Resultatene er oppsummert i tabell 6.6. Som det vises i tabellen ble det ikke registrert noen signaler for de undersøkte masseovergangene.

**Tabell 6.5:** Resultater fra fosfolipid-monitoreringsstudie av PALME-ekstrakter. + indikerer at  $S/N$  er større enn 3 og følgelig har det blitt registrert signal for den aktuelle masseovergangen, - indikerer at  $S/N$  er mindre enn 3 og dermed har det ikke blitt registrert signal for den aktuelle masseovergangen.

Masse- overganger	Type væskemembran			
	Blank akseptorfase	Diheksyleter	Dodecylacetat	Isopentylbenzen
524,5→184,1	-	-	-	-
760,5→184,1	-	-	-	+
772,6→184,1	-	-	-	+
454,3→313,3	-	-	-	-
524,3→339,3	-	-	-	-
731,6→184,1	-	-	-	+
758,0→184,1	+	-	-	+
804,0→184,0	-	-	-	+
520,7→184,2	-	-	-	-
522,6→184,2	-	-	-	-
782,7→184,2	-	-	-	+
786,7→184,0	-	-	-	+
806,0→184,2	-	-	-	+
513,2→341,2	-	-	-	-
704,0→184,0	-	-	-	-
768,6→627,5	-	-	-	-
784,0→184,0	-	-	-	+
808,0→184,0	-	-	-	+

Prøvevolum: 250  $\mu$ l (plasma); væskemembran: isopentylbenzen-, diheksyleter- og dodecylacetat-basert; akseptorplate: PP-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; NaOH-konsentrasjon 20mM;

**Tabell 6.6:** Resultater fra fosfolipid-monitoreringsstudie av PALME-ekstrakter. + indikerer at  $S/N$  er større enn 3 og følgelig har det blitt registrert signal for den aktuelle masseovergangen, - indikerer at  $S/N$  er mindre enn 3 og dermed har det ikke blitt registrert signal for den aktuelle masseovergangen.

Masse- overganger	Type væskemembran			
	Blank akseptorfase	Diheksyleter	Dodecylacetat	Isopentylbenzen
524,5→184,1	-	-	-	-
760,5→184,1	-	-	-	-
772,6→184,1	-	-	-	-
454,3→313,3	-	-	-	-
524,3→339,3	-	-	-	-
731,6→184,1	-	-	-	-
758,0→184,1	+	-	-	-
804,0→184,0	-	-	-	-
520,7→184,2	-	-	-	-
522,6→184,2	-	-	-	-
782,7→184,2	-	-	-	-
786,7→184,0	-	-	-	-
806,0→184,2	-	-	-	-
513,2→341,2	-	-	-	-
704,0→184,0	-	-	-	-
768,6→627,5	-	-	-	-
784,0→184,0	-	-	-	-
808,0→184,0	-	-	-	-

Prøvevolum: 250  $\mu$ l (plasma); væskemembran: isopentylbenzen-, diheksyleter- og dodecylacetat-basert; akseptorplate: PP-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; NaOH-konsentrasjon 20mM;

**Tabell 6.7:** Resultater fra fosfolipid-monitoreringsstudie av PPT-supernatanten og SPE-ekstrakter. + indikerer at  $S/N$  er større enn 3 og dermed har det blitt registrert signal for den aktuelle masseovergangen, - indikerer at  $S/N$  er mindre enn 3 og følgelig har det ikke blitt registrert signal for den aktuelle masseovergangen. (+) indikerer at  $S/N$  er  $\approx 3$ .

	SPE	PPE
524,5→184,1	+	+
760,5→184,1	+	+
772,6→184,1	(+)	+
454,3→313,3	-	+

Tabell 6.7 fortsetter;

524,3→339,3	-	-
731,6→184,1	(+)	(+)
758,0→184,1	+	+
804,0→184,0	(+)	(+)
520,7→184,2	+	+
522,6→184,2	+	+
782,7→184,2	+	+
786,7→184,0	+	+
806,0→184,2	+	+
513,2→341,2	-	-
704,0→184,0	+	+
768,6→627,5	-	-
784,0→184,0	+	+
808,0→184,0	(+)	+

**SPE:** *Prøvevolum: 1000 µl (plasma + rensset vann); SPE-kolonne: Oasis MCX; reløsningsmiddel; 200 µl mobilfase A*

**PPE:** *Prøve: legemiddelfritt plasma; fellingsreagens: acetonitril; sentrifugering: ved 10000 rpm i 10 minutter*

Når man tar en helhetsvurdering av resultatene kan man konkludere med at PALME-ekstrakter med PVDF-baserte akseptorplater gir fosfolipidfrie ekstrakter. PVDF har tidligere vist uspesifikk binding av legemidler og endogene komponenter [9]. På grunn av dette kan man risikere å feiltolke disse resultatene. Man vet ikke med sikkerhet om ekstraktenes renhet skyldes PVDF-membranen eller PALME-teknikken. Det er derfor viktig å gjøre de samme analysene med PP-baserte akseptorplater hvis de blir kommersielt tilgjengelige.

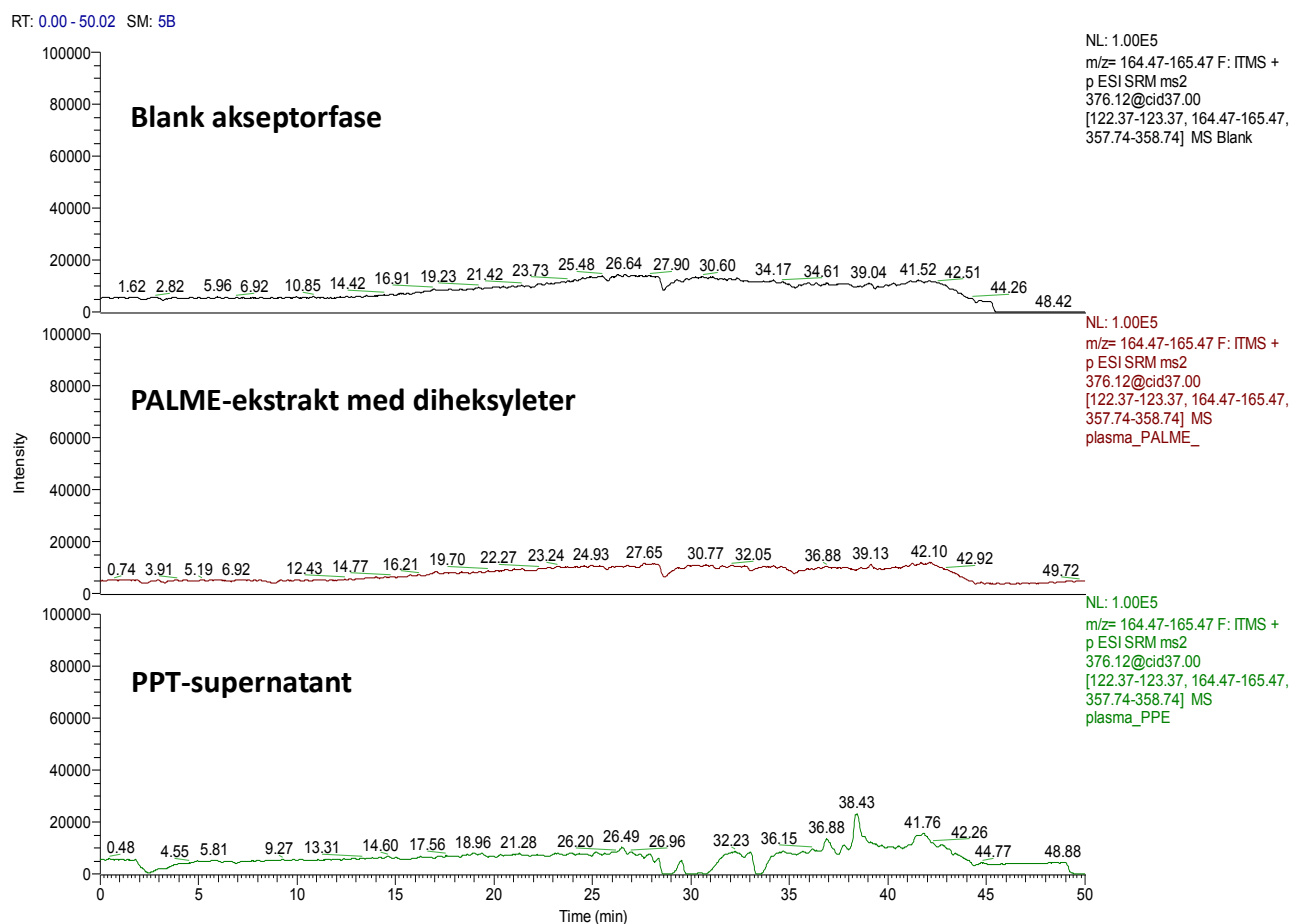
## 6.2.4 Evaluering av matrikseffekter i LC-MS

I tillegg til monitorering av fosfolipider og UV-absorberende komponenter i ekstraktene ble det gjort en studie hvor det ble undersøkt for kvantitative og kvalitative matrikseffekter i LC-MS.

### Kvalitativ evaluering av matrikseffekter i LC-MS

Det ble utført en postkolonneinfusjonsstudie for å undersøke potensielle signalsuppresjoner. Ekstrakter fra PALME og PPT ble injisert i LC-MS med kontinuerlig infusjon (postkolonne) av en standardløsning av modellanalyttene quetiapin, fluoxetin, amitriptylin og haloperidol.

Alle modellanalyttene hadde en konsentrasjon på 20 ng/ml i standardløsningen. Blank akseptorfase ble brukt som referanse. Figur 6.10.a og 6.10.b viser resultater fra postkolonneinfusjonsstudie av modellanalytten haloperidol. Modellanalyttene quetiapin, amitriptylin og fluoxetin viste samme tendens og ble derfor ikke fremvist her. Når man injiserer en ren løsning inn i LC-MS og samtidig injiserer en standardløsning postkolonne vil man få et konstant signal. Hvis man får en økning eller reduksjon av signalene vil det bety at det har skjedd noe under ioniseringen i MS.



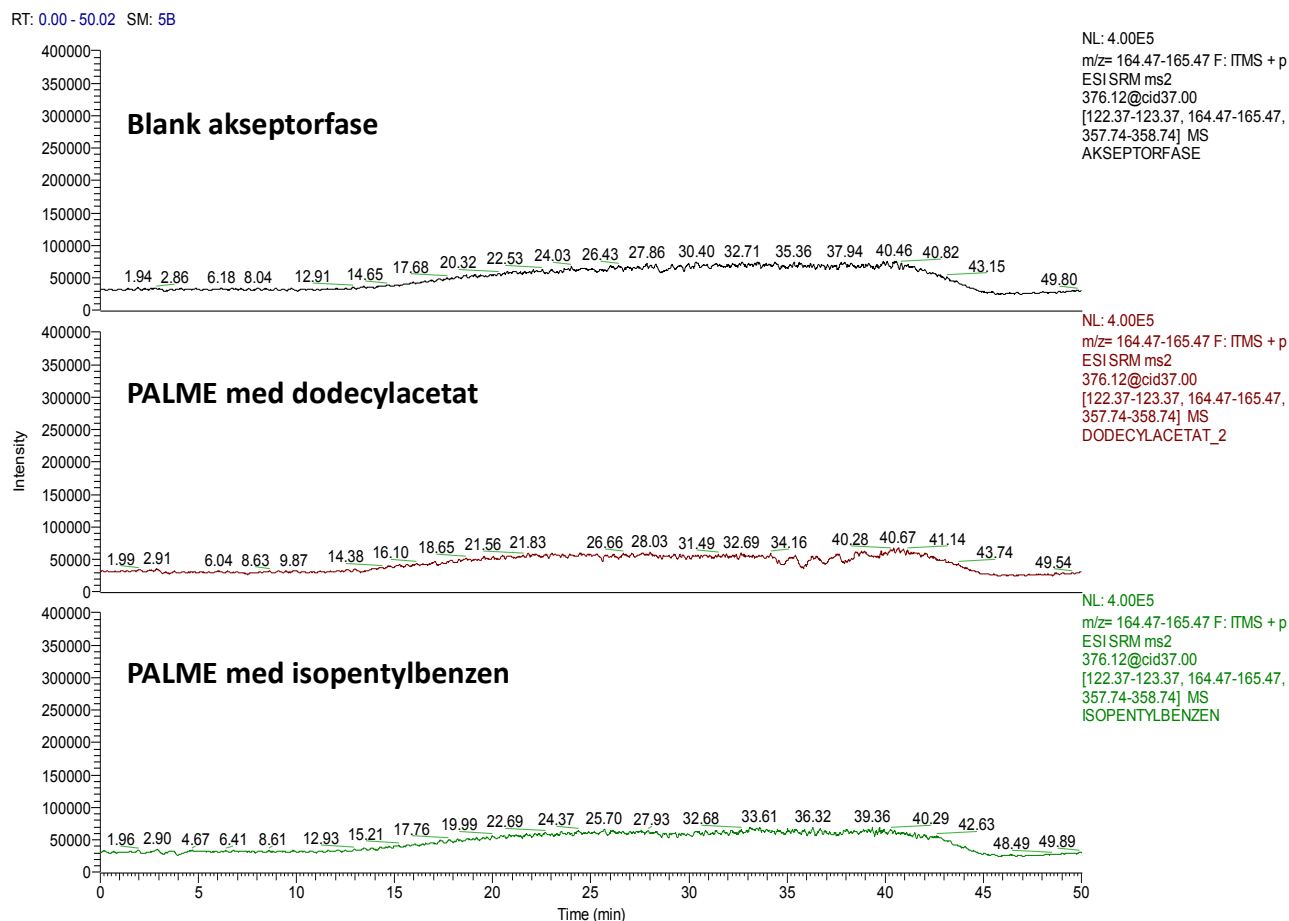
**Figur 6.10.a: Resultater fra postkolonneinfusjonsstudie for modellanalytten haloperidol.**

**PALME:** Prøvevolum: 250  $\mu$ l (plasma); væskemembran: diheksyleter-basert; akseptorplate: PP-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; NaOH-konsentrasjon 20mM;

Analyttkonsentrasjon i standardløsning: 20 ng/ml;

**PPE:** Prøve: legemiddelfritt plasma; fellingsagent: acetonitril; sentrifugering: ved 10000 rpm i 10 minutter

Analyttkonsentrasjon i standardløsning: 20 ng/ml;



**Figur 6.10.b: Resultater fra postkolonneinfusjonsstudie for modellanalytten haloperidol.**

Prøvevolum: 250  $\mu$ l (plasma); væskemembran: dodecylacetat- og isopentylbenzen -basert; akseptorplate: PP-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; NaOH-konsentrasjon 20mM; Analyttkonsentrasjon i standardløsning: 20 ng/ml;

Som det vises i figur 6.10.a var signalet fra blank akseptorfasen nesten konstant og det var ingen reduksjon eller økning av signalet. Det samme gjelder for signalet fra PALME-ekstraktet med diheksyleter basert væskemembran. Dette kromatogrammet er nesten identisk med det tilsvarende fra blank akseptorfase, og med andre ord ble det ikke observert matrikseffekter i LC-MS i dette tilfelle. Resultatet for PALME-ekstraktet med isopentylbenzen som væskemembran viser omtrent det samme, altså var signalet nesten konstant. For PALME med dodecylacetat som væskemembran vises at signalet var konstant til tiden ca. 33 min, og i tidsperioden fra ca. 33 min til ca. 41 min var det periodevis reduksjon

av signalet (se figur 6.10.b). Dette kan skyldes enten en lekkasje under ekstraksjonsprosessen eller at ekstrakter med dodecylacetat væskemembraner ikke fjernet alle matrikskomponenter og dermed ga matrikseffekter i LC-MS. Siden akseptorplatene var ”hjemmelagede” og ikke var testet for lekkasje er den første forklaringen mest logisk. For å kunne trekke en sikker konklusjon bør samme studie utføres med ekstrakter fra en kommersielt tilgjengelig akseptorplate.

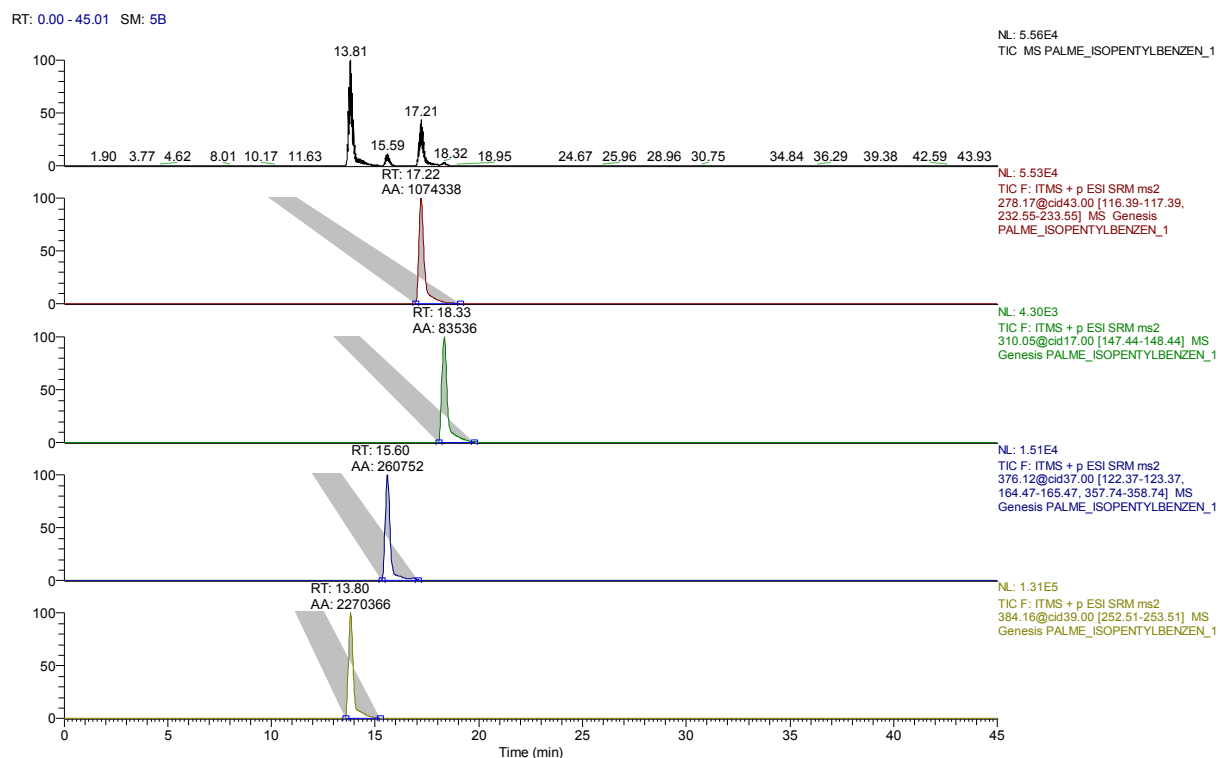
Som man ser i tabell 6.7, inneholdt supernatanten fra PPT alle de undersøkte fosfolipidene. For sammenligning ble det derfor gjort en postkolonneinfusjonsstudie av PPT-supernatanten. Som man ser i figuren (figur 6.10.a) fluktuerer signalet betydelig, hvilket indikerer både ioneundertrykking ionforsterkning. Dette er som forventet, og bekrefter resultatene i seksjon 6.2.3.

### **Kvantitativ evaluering av matrikseffekter i LC-MS**

Postkolonneinfusjonsstudien var en kvalitativ måling av matrikseffekter i LC-MS, og den viser bare at det er enten en ione-suppresjon/forstrekning eller det er ingen matrikseffekter. Den sier ingenting om hvor store matrikseffektene er. For å si noe om graden av matrikseffekter i LC-MS ble det gjort en studie hvor det ble undersøkt graden av matrikseffekter. Siden PVDF-baserte akseptorplater ga ”renere” ekstrakter enn polypropylen-baserte akseptorplater ble denne studien gjennomført med PVDF-baserte akseptorplater.

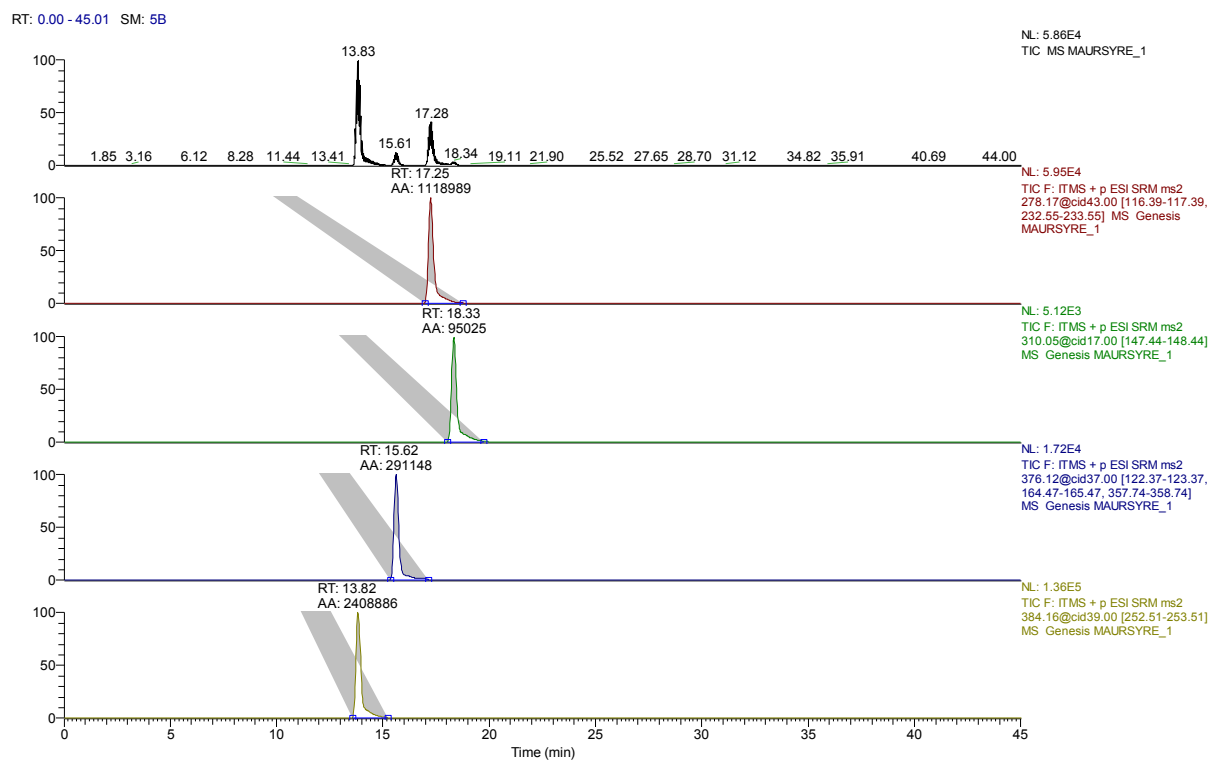
Væskemembranene som ble brukt i postkolonneinfusjonsstudien ble også brukt i denne studien. Ekstraktene fra blank plasma ble oppsamlet i seks eppendorfrør. Deretter ble 90 µl ekstrakt fra hvert enkelt rør spiket med 10 µl standardløsning. Denne standardløsningen bestod av modellanalyttene quetiapin, fluoxetin, amitripylin og haloperidol med konsentrasjoner henholdsvis på 1 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml og 0,1 µg/ml. Det ble deretter laget seks paralleller av spiket blank akseptorfase, hvor 90 µl 20 mM maursyre ble spiket med 10 µl standardløsning. For hver væskemembran ble det laget seks nye paralleller av spiket akseptorfase. Disse prøvene ble analysert på LC-MS.

Figur 6.11 og 6.12 viser henholdsvis kromatogrammer fra spiket PALME-ekstrakt og akseptorfase. Som det vises i figuren ga LC-MS metoden god separasjon av modellanalyttene.



**Figur 6.11: LC-MS kromatogram over resultater fra analyser på spiket PALME-ekstrakt.**

Prøvevolum: 250  $\mu$ l (plasma); væskemembran: isopentylbenzen-basert; akseptorplate: PP-basert; analyttkonsentrasjon etter spiking: 0,01 – 0,2  $\mu$ g/ml; ekstraksjonstid: 30 minutter; NaOH-konsentrasjon 20mM;



**Figur 6.12: LC-MS kromatogram over resultater fra analyser på spiket akseptorfase.**

Analyttkonsentrasjon etter spiking: 0,01 – 0,2  $\mu$ g/ml



Etter endt analyse ble modellanalyttenes topparealer fra hvert PALME-ekstrakt sammenlignet med de tilsvarende topparealer fra akseptorfase. Deretter ble areal forholdet beregnet. Et areal forhold ( $\frac{\text{Ekstrakt}}{\text{Akseptorfase}}$ ) på 1 (100 %) indikerer fravær av matrikseffekt i LC-MS. Et areal forhold som er større eller mindre enn 1 (100 %) vil henholdsvis bety ionforsterkning eller ionesuppresjon.

Tabell 6.8 oppsummerer resultatene fra kvantitativ matrikseffekt målingene. Som man ser fra tabellen, ga de ulike væskemembranene ulike resultater for hver modellanalytt. RSD-verdiene varierte innenfor 2,55 til 13,82 %. PALME-ekstrakter fra både isopentylbenzen og dodecylacetat baserte væskemembraner viser seg å være utsatt for ionesuppresjon mens PALME-ekstrakter fra diheksyleter baserte væskemembraner ga noe ionforsterkning. Tabellen viser også at forskjellen i arealforholdet av modellanalyttene i PALME-ekstrakter med diheksyleter og isopentylbenzen som SLM og blank akseptorfase var mindre enn 10 %. Som det er nevnt tidligere i denne seksjonen ble det brukt 10 µl av standardløsning til spiking av PALME-ekstrakter og blank akseptorfase. En liten forskjell i spiket volum vil påvirke resultatene betydelig. Når man tar hensyn til denne usikkerheten kan det konkluderes med at PALME-ekstrakter med diheksyleter og isopentylbenzen som SLM gir trolig ingen matrikseffekter i LC-MS for de undersøkte modellanalyttene.

**Tabell 6.8:** Resultater fra kvantitativ matrikseffekt målinger. Tabellen viser areal forholdet i % for modellanalyttene. Tallene i parentesene representerer RSD verdiene i %.

Modellanalytt	Type væskemembran		
	Diheksyleter	Isopentylbenzen	Dodecylacetat
Quetiapin	106,02 (6,91)	98,81 (5,45)	65,05 (3,94)
Haloperidol	108,47 (4,61)	99,93 (8,36)	74,04 (4,28)
Amitriptylin	102,92 (4,04)	99,91 (6,14)	96,54 (2,55)
Fluoxetin	98,38 (7,31)	95,90 (13,72)	91,99 (6,31)

*Prøvevolum: 250 µl (plasma); væskemembran: diheksyleter-, isopentylbenzen- og dodecylacetat-basert; akseptorplate: PVDF-basert; ekstraksjonstid: 30 minutter; analyttkonsentrasjon 0,1 – 2 µg/ml; NaOH-konsentrasjon 20mM;*

Resultatene fra PALME-ekstrakter med dodecylacetat var litt annerledes. Forskjellen i arealforholdet av modellanalyttene amitriptylin og fluoxetin i PALME-ekstraktet med dodecylacetat og blank akseptorfase var mindre enn 10 %, mens forskjellen i arealforholdet

for modellanalyttene haloperidol og quetiapin var større enn 10 % (henholdsvis 26 % og 35 %). Basert på disse resultatene kan det konkluderes med at PALME-ekstrakter med dodeylacetat som SLM gir trolig ingen matrikseffekter for modellanalyttene amitriptylin og fluoxetin, og det gir ionesuppresjon av modellanalyttene haloperidol og quetiapin.

Som det er nevnt tidligere i denne seksjonen ble denne studien utført med kommersielt tilgjengelige PVDF-baserte akseptorplater. Som det også ble nevnt tidligere i dette kapittelet har PVDF uspesifikk binding av legemidler [9], og det er derfor viktig å gjennomføre denne studien med en polypropylen-basert akseptorplate når slike blir kommersielt tilgjengelige. Denne studien bør ikke gjennomføres med de ”hjemmelagede” akseptorplatene, fordi disse akseptorplatene er ikke testet for lekkasje og man har ikke en konstant tykkelse på membranfilteret. Dette vil si at tykkelsen av membranfilteret vil variere fra brønn til brønn.

Basert på studiene på monitorering av fosfolipider, postkolonneinfusjon og kvantitativ matrikseffektmåling kan man konkludere med at PALME-ekstrakter er relativt ”rene”, men alle disse studiene bør gjennomføres med polypropylen-baserte akseptorplater hvis de blir kommersielt tilgjengelige.

## 7 KONKLUSJON

Dette arbeidet har vist muligheten for ekstraksjon i et multibrønns konsept basert på væske-væske ekstraksjon. For første gang ble det vist at PALME som et nytt konsept for væske-væske ekstraksjon gir relativt rene ekstrakter fra plasmaløsninger. For første gang ble PALME sammenlignet med fast-faseekstraksjon og proteinfelling med hensyn på renhet. Bruken av organisk løsningsmiddel var lavere ved PALME sammenlignet med fast-faseekstraksjon og proteinfelling. PALME-ekstrakter ga "renere" ekstrakter enn fast-faseekstraksjon og proteinfelling.

Både kommersielt tilgjengelige og "hjemmelagede" akseptorplater ble testet. Det ble vist at akseptorplater som er basert på polyvinylidenfluorid, og som er kommersielt tilgjengelige, ga renere ekstrakter enn "hjemmelagede" polypropylen-baserte akseptorplater. I tillegg ble det vist at polypropylen-baserte akseptorplater ga ekstrakter som var frie for Na<sup>+</sup> og andre UV-absorberende komponenter. Det har blitt vist at polyvinylidenfluorid-baserte akseptorplater ga ekstrakter som var frie for de mest vanlige fosfolipidene man finner i humant plasma.

Tre organiske løsningsmidler ble testet med hensyn på renhet og ekstraksjonsutbytter. Det ble vist at kombinasjonen av isopentylbenzen og polyvinylidenfluorid-baserte akseptorplater ga de "reneste" ekstrakter, og graden av matrikseffekter relatert til LC-MS var mindre eller lik 4,1 %. Resultatene viser at dodecylacetat baserte væskemembraner ga høyest utbytte for modellanalyttene uavhengig av type akseptorplate. Ekstraksjonsutbytter fra plasma for modellanalyttene var mellom 54,9 – 75,6 % og RSD verdien var under 9 %. Uavhengig av type væskemembran, var RSD-verdiene fra polyvinylidenfluorid-baserte akseptorplater generelt lavere enn polypropylen-baserte akseptorplater. Ekstraksjonsutbytter fra polypropylen-baserte akseptorplater var høyere enn fra polyvinylidenfluorid-baserte akseptorplater.

Dette arbeidet har vist hvor enkelt og lett matrikseffekter kan unngås uten å gjøre en omfattende prøveopparbeidelse eller bruke store ressurser. Forhåpentligvis vil dette arbeidet på sikt gjøre at flere blir interessert i, og ønsker å være med på videreutvikling av PALME. Ekstraksjonsutbytter var lavere enn 100 %. Det trengs derfor mer forskning for å få mer kunnskap om hvordan graden av ekstraksjonsutbytter vil påvirke kvantitativ analyse av legemidler i plasma. Siden det er kjent at polyvinylidenfluorid har uspesifikk binding av

legemidler, anbefales det at samme studier utføres med polypropylenmembraner hvis de blir kommersielt tilgjengelige.

# Referanser

1. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Analytical chemistry, 1990. **62**(19): p. 2145-2148.
2. Pawliszyn, J. and S. Pedersen-Bjergaard, *Analytical microextraction: current status and future trends*. Journal of chromatographic science, 2006. **44**(6): p. 291-307.
3. Liu, H. and P.K. Dasgupta, *Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(11): p. 1817-1821.
4. He, Y. and H. Lee, *Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(22): p. 4634-4640.
5. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
6. Gjelstad, A., K.E. Rasmussen, and S. Pedersen-Bjergaard, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: tuning the membrane chemistry to different types of drug substances*. Journal of Chromatography A, 2006. **1124**(1): p. 29-34.
7. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: new concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A, 2006. **1109**(2): p. 183-190.
8. Seidi, S., et al., *Determination of thebaine in water samples, biological fluids, poppy capsule, and narcotic drugs, using electromembrane extraction followed by high-performance liquid chromatography analysis*. Analytica chimica acta, 2011. **701**(2): p. 181-188.
9. Gjelstad, A., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format*. Bioanalysis, 2013. **5**(11): p. 1377-1385.
10. Chambers, E., et al., *Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses*. Journal of Chromatography B, 2007. **852**(1): p. 22-34.
11. Ghosh, C., C.P. Shinde, and B.S. Chakraborty, *Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis*. Journal of Chromatography B, 2012. **893**: p. 193-200.
12. Ismaiel, O.A., et al., *Monitoring phospholipids for assessment of matrix effects in a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for hydrocodone and pseudoephedrine in human plasma*. Journal of Chromatography B, 2007. **859**(1): p. 84-93.
13. Janusch, F., et al., *Evaluation and subsequent minimization of matrix effects caused by phospholipids in LC-MS analysis of biological samples*. Bioanalysis, 2013. **5**(17): p. 2101-2114.
14. Lanckmans, K., et al., *Quantitative liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of microdialysates*. Talanta, 2008. **74**(4): p. 458-469.
15. Olejnik, M., et al., *Influence of matrix effect on the performance of the method for the official residue control of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal muscle*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2013. **27**(3): p. 437-442.
16. Shen, J.X., et al., *Minimization of ion suppression in LC-MS/MS analysis through the application of strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-SPE)*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2005. **37**(2): p. 359-367.

17. Taylor, P.J., *Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry*. Clinical biochemistry, 2005. **38**(4): p. 328-334.
18. Xia, Y.Q. and M. Jemal, *Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009. **23**(14): p. 2125-2138.
19. Ismaiel, O.A., et al., *Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(31): p. 3303-3316.
20. Pedersen-Bjergaard, S., et al., *Liquid-phase microextraction of basic drugs–Selection of extraction mode based on computer calculated solubility data*. Journal of separation science, 2005. **28**(11): p. 1195-1203.
21. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**(1): p. 132-142.
22. Folde Bårdstu, K., et al., *Supported liquid membranes in hollow fiber liquid-phase microextraction (LPME)–Practical considerations in the three-phase mode*. Journal of separation science, 2007. **30**(9): p. 1364-1370.
23. Halvorsen, T.G., et al., *Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples*. Journal of separation science, 2003. **26**(17): p. 1520-1526.
24. Gjelstad, A., et al., *Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction in the Three-Phase Mode – Practical Considerations*. LCGC NORTH AMERICA, 2011. **29**(12): p. 1038-1045.
25. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2 ed. 2010, Bergen: Fagbokforlaget.
26. Hydrofob-stasjonærfase. Available from: <http://chem-net.blogspot.no/2013/11/reversed-phase-chromatography.html>; Sist besøkt: 13.05.14.
27. Niessen, W., *Progress in liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening*. Journal of Chromatography A, 2003. **1000**(1): p. 413-436.
28. Ermer, J. and M. Vogel, *Applications of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis*. Biomedical Chromatography, 2000. **14**(6): p. 373-383.
29. Figur av APCI. Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Atmospheric-pressure\\_chemical\\_ionization](http://en.wikipedia.org/wiki/Atmospheric-pressure_chemical_ionization); Sist besøkt: 13.05.14.
30. Lim, C.-K. and G.A. Lord, *Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002. **25**(5): p. 547-557.
31. Figur av ESI. Available from: <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/mass-spectrometry-bioanalysis.html>; Sist besøkt: 13.05.14.
32. Figur av kvadrupol. Available from: <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/ms/quadrupo.htm>; Sist besøkt: 13.05.14.
33. Lemièrre, F., *Mass analysers for LC-MS*. Guide to LC-MS, sl, LC-GC Europe, 2001: p. 22-28.
34. Guilhaus, M., *Special feature: Tutorial. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts*. Journal of Mass Spectrometry, 1995. **30**(11): p. 1519-1532.

35. King, R., et al., *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2000. **11**(11): p. 942-950.
36. Bonfiglio, R., et al., *The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1999. **13**(12): p. 1175-1185.
37. Buhrman, D.L., P.I. Price, and P.J. Rudewiczcor, *Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a study of ion suppression*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1996. **7**(11): p. 1099-1105.
38. Peoples, M.C., et al., *Assessment of matrix effects and determination of niacin in human plasma using liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Biomedical Chromatography, 2008. **22**(11): p. 1272-1278.
39. Altria, K., et al., *Inter-company cross validation exercise on capillary electrophoresis. Quantitative determination of drug counter-ion level*. Chromatographia, 1995. **40**(1-2): p. 47-50.
40. Altria, K., D. Goodall, and M. Rogan, *Quantitative determination of drug counter-ion stoichiometry by capillary electrophoresis*. Chromatographia, 1994. **38**(9-10): p. 637-642.
41. Pang, L.-Q., et al., *Simultaneous determination and quantification of seven major phospholipid classes in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry and the application in diabetes nephropathy*. Journal of Chromatography B, 2008. **869**(1): p. 118-125.
42. Huang, C., et al., *Development of a flat membrane based device for electromembrane extraction: A new approach for exhaustive extraction of basic drugs from human plasma*. Journal of Chromatography A, 2014. **1326**: p. 7-12.
43. Pedersen-Bjergaard, S., T.S. Ho, and K.E. Rasmussen, *Fundamental studies on selectivity in 3-phase liquid-phase microextraction (LPME) of basic drugs*. Journal of separation science, 2002. **25**(3): p. 141-146.
44. Kjemiske egenskaper til modellanalyttene; Available from: <http://www.chemicalize.org/>; Sist besøkt: 13.05.14.
45. Molekylstruktur av modellanalyttene og organiske løsningsmidler. Available from: <http://www.chemspider.com/>; Sist besøkt: 13.05.14.
46. PVDF-basert-akseptorplate; Available from: <http://www.millipore.com/catalogue/module/c7702%20-%2000>; Sist besøkt: 13.05.14.
47. Hernandez, F., J. Sancho, and O. Pozo, *Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2005. **382**(4): p. 934-946.
48. Ismaiel, O.A., et al., *Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations*. Journal of Chromatography B, 2008. **875**(2): p. 333-343.
49. Niessen, W., P. Manini, and R. Andreoli, *Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry*. Mass spectrometry reviews, 2006. **25**(6): p. 881-899.
50. Van Eeckhaut, A., et al., *Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(23): p. 2198-2207.
51. Ekdahl, A., M.C. Johansson, and M. Ahnoff, *Tracing and separating plasma components causing matrix effects in hydrophilic interaction chromatography-*

- electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2013. **923**: p. 83-91.
52. Lindegårdh, N., et al., *Development and validation of a liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method for determination of oseltamivir and its metabolite oseltamivir carboxylate in plasma, saliva and urine*. Journal of Chromatography B, 2007. **859**(1): p. 74-83.
  53. Kloepper, A., J.B. Quintana, and T. Reemtsma, *Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples*. Journal of chromatography A, 2005. **1067**(1): p. 153-160.
  54. Heller, D.N., *Ruggedness testing of quantitative atmospheric pressure ionization mass spectrometry methods: the effect of co-injected matrix on matrix effects*. Rapid communications in mass spectrometry, 2007. **21**(5): p. 644-652.
  55. Bakhtiar, R. and T.K. Majumdar, *Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological fluids using liquid chromatography–mass spectrometry*. Journal of pharmacological and toxicological methods, 2007. **55**(3): p. 227-243.
  56. Dams, R., et al., *Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(11): p. 1290-1294.
  57. Jessome, L.L. and D.A. Volmer, *Ion suppression: a major concern in mass spectrometry*. 2006.
  58. Jiang, H., et al., *Systematic evaluation of supported liquid extraction in reducing matrix effect and improving extraction efficiency in LC–MS/MS based bioanalysis for 10 model pharmaceutical compounds*. Journal of Chromatography B, 2012. **891**: p. 71-80.
  59. Meng, M., et al., *A systematic approach for developing a robust LC-MS/MS method for bioanalysis*. Bioanalysis, 2013. **5**(1): p. 91-115.
  60. Van Damme, T., et al., *Solid-phase extraction based on hydrophilic interaction liquid chromatography with acetone as eluent for eliminating matrix effects in the analysis of biological fluids by LC-MS*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2014. **406**(2): p. 401-407.